



Ana Filipa Teixeira Gomes

Licenciada em Bioquímica

**Implementação da ISO 16266- Detecção e contagem
de *Pseudomonas aeruginosa* em água de consumo por
membrana de filtração**

**Dissertação para obtenção do Grau de Mestre
em Tecnologia e Segurança Alimentar**

Orientadora: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão
Leitão, Professora Auxiliar, FCT-UNL

Coorientadora: Engenheira Sandra Nunes, Responsável
Técnica de Laboratório de Microbiologia, SGS Portugal,
S.A

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes
Arguente: Doutora Maria de Fátima Gonçalves Ribeiro dos Santos Silva Lopes
Vogal: Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2017





Ana Filipa Teixeira Gomes

Licenciada em Bioquímica

**Implementação da ISO 16266- Detecção e contagem
de *Pseudomonas aeruginosa* em água de consumo por
membrana de filtração**

**Dissertação para obtenção do Grau de Mestre
em Tecnologia e Segurança Alimentar**

Orientadora: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão
Leitão, Professora Auxiliar, FCT-UNL

Coorientadora: Engenheira Sandra Nunes, Responsável
Técnica de Laboratório de Microbiologia, SGS Portugal,
S.A

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes
Arguente: Doutora Maria de Fátima Gonçalves Ribeiro dos Santos Silva Lopes
Vogal: Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Setembro 2017

“Implementação da ISO 16266- Detecção e contagem de *Pseudomonas aeruginosa* em água de consumo por membrana de filtração” COPYRIGHT© 2017 de Ana Filipa Teixeira Gomes, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

“A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

Agradecimentos

Qualquer conquista, mesmo que pessoal, está associada a vários fatores como a nossa vivência, persistência, mas também às pessoas que se cruzam no nosso caminho. Como tal expresso o meu agradecimento:

- À minha orientadora, Prof.^a. Ana Lúcia Leitão, por todo o ensinamento e conhecimento partilhado ao longo do mestrado, mas principalmente pelas palavras e força, tão importantes para a entrega desta dissertação.

- À Eng^a. Sandra Nunes, e consequentemente à SGS, S.A., pela possibilidade e orientação na realização do estágio.

- À equipa do laboratório de microbiologia por tão boa receção e partilha de conhecimentos. Em especial, à Carina e à Cármen pelo apoio, ajuda e companheirismo.

- A todos os meus amigos, que me acompanharam ao longo da minha vida, e em especial aqueles que acompanharam de perto o desenvolvimento desta dissertação. O meu sincero obrigada pela preocupação, palavras de força e incentivo, pelos momentos de riso e de choro.

- Às famílias que me tratam como se fosse realmente delas, família Morgado, Tó e Beta, por todo o acompanhamento e carinho desde sempre, à família Antunes, Raquel, Sr. Zé Carlos e Dona Amélia, por todo o incentivo, presença, partilha e amor recebidos.

- Às minha amigas Vanessa, Daniela e Melissa, pela amizade e apoio.

- Aos amigos que a FCT me fez conhecer, à Mariana e ao Hernâni, que mesmo estando longe há sempre uma amizade enorme.

- À Mafalda um agradecimento muito especial por tudo.

- Às minhas avós, Fernanda e Mariana, porque me ensinam e mostram desde sempre a garra de uma verdadeira mulher. Ao meu avô Teixeira, por toda a preocupação demonstrada pelo conhecimento, ensinamento da verdade e partilha, mesmo que não se recorde, a marca é demasiado profunda no meu crescimento.

- Ao Ricardo por todo o carinho, força, paciência, dedicação e amor, muito obrigada!

- Por fim, agradeço ao melhor que a vida me deu, a minha família, os meus pais e irmã, sem eles nada era possível. Ao meu pai o meu agradecimento profundo, por toda a coragem, incentivo, luta e garra. À minha mãe, o meu obrigada, por todo o carinho, palavras, amizade e força. À minha Rita, a minha gratidão por toda a paciência, amizade, companheirismo e cuidado. A eles dedico este trabalho, com muito amor! O meu sincero obrigada!

Resumo

A qualidade da água de consumo é uma preocupação e uma questão de saúde pública, são cada vez mais os agentes patogénicos transmitidos através da água, sendo por isso do interesse público os requisitos cada vez mais específicos para o controlo da água de consumo.

A água para o consumo humano é um recurso cada vez mais escasso que deve ser protegido e tratado como tal. Embora o acesso à água potável esteja a melhorar em todo o mundo, existe ainda um grande número de pessoas que não tem acesso à água tratada, como tal o risco de contaminação por parte de agentes patogénicos é muito maior.

De acordo com a legislação portuguesa DL 306:2007, para água destinada ao consumo humano (rede de distribuição, fontanários, reservatórios, etc.) existem valores obrigatórios para *Escherichia coli* e *Enterococcus*, contudo em águas engarrafadas ou em outros recipientes existem valores paramétricos para mais microrganismos sendo, *E. coli*, *Enterococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, e o número total de colónias que se desenvolvem a 22 °C e a 37 °C.

O presente trabalho foca-se na implementação da norma ISO 16266:2006, normativo, para a deteção e enumeração de *Pseudomonas aeruginosas*, através do método de filtração de membrana, incubada depois num meio específico e quando necessário, a realização dos testes de confirmação. O estágio foi realizado na empresa SGS. Portugal, e teve também como objetivo a pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* em 10 fontes de águas para potencial consumo humano, com aplicação da ISO 16266:2006.

Com base nos resultados obtidos, nas normas legislativas e na recomendação da ERSAR nº1/2017, do DL 306-2007, o método encontra-se validado e implementado, na SGS Portugal, S.A. Por outro lado, as águas analisadas demonstraram resultados negativos para a presença de *P. aeruginosa*, contudo não se pode afirmar segurança das mesmas para consumo humano.

Palavras-chave: água de consumo, *Pseudomonas aeruginosa*, ISO 16266:2006, água de fontes

Abstract

The quality of water for human consumption is a concern subject, since pathogenic agents transmitted through water are constantly increasing. Specific requirements to help in the control of drinking water are of public interest.

Drinkable water is an increasingly rare resource that should be treated and also protected. Even though, the access to potable water is improving all over the world, there is still a large amount of people who don't have access to potable water, which means the contamination from pathogenic agents is more likely to occur.

The mandatory microorganisms analysis to Portuguese legislation DL 306:2007, for water destined to human consumption (distribution networks, fountains, reservatories, etc) are *Escherichia coli* and *Enterococcus*, although water that is bottled or in other containers has as parametric values *E. coli*, *Enterococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, total number of colonies that grow at 22 °C and 37 °C.

The current task is focused on the implementation of NP ISO 16266:2006, for detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*, through the method of membrane filtration, incubated under the specific conditions for the medium and, if necessary, confirmation tests. The internship was conducted at SGS Portugal and it also aimed the investigation of *Pseudomonas aeruginosa* on 10 public water fountains, applying ISO 16266:2006.

Based on the obtained results, legislated norms and ERSAR nº1/2017's recommendation of the DL 306-2007, the method was validated and implemented at SGS Portugal, S.A. On the other hand, analysed public water fountains showed negative results for the presence of *P. aeruginosa*, however we can not assure their safety for human consumption.

Keywords: consumption water, *Pseudomonas aeruginosa*, ISO 16266:2006, public water fountains

Índice de Matérias

1- Objetivo e Organização do trabalho	1
2- Enquadramento teórico	3
2.1- Água de consumo	3
2.1.1- Qualidade microbiológica da água de consumo	4
2.1.2- Agentes patogénicos na água	5
2.2- <i>Pseudomonas</i>	9
2.2.1- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
2.2.1.1- Descrição geral	11
2.2.1.2- Importância médica e efeitos na saúde humana	14
2.2.1.3- Fatores de virulência	15
2.3- Norma ISO 16266.2006- Qualidade da água- Detecção e enumeração de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - método por filtração de membrana	17
2.3.1- Confirmação de colónias não características	18
2.3.1.1- Castanhas avermelhadas não fluorescentes	18
2.3.1.2- Fluorescentes não produtoras de piocianina	20
2.3.2- Contagem de colónias <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
3- Caracterização da empresa	21
3.1- Laboratório de microbiologia	22
4- Materiais e Métodos	25
4.1- Método de Filtração por membrana	25
4.2- Reagentes	25
4.2.1- Meio de cultura seletivo para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
4.2.2- Meio nutritivo PCA agar	27
4.3- Meios e reagentes para testes de confirmação	27
4.3.1- Meio King B	27

4.3.2- Caldo acetamida	28
4.3.3- Reagente Nesser	29
4.3.4- Reagente oxidase	29
4.4- Procedimento experimental para a implementação do método ISO 16266:2006	30
4.4.1- Preparação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 12903	30
4.4.2- Preparação das diluições	30
4.4.3- Filtração e incubação	31
4.4.4- Contagem das colónias	31
4.4.5- Validação da metodologia	31
4.4.5.1- Controlo da qualidade interno	32
4.4.5.2- Critério de Precisão	33
4.4.5.3- Estimativa das Incertezas	34
4.4.5.4- Ensaio Interlaboratorial	35
4.5- Procedimento experimental para a pesquisa de <i>Pseudomonas aeruginosas</i> em águas de fontes usadas potencialmente para consumo	36
4.5.1- Amostras	37
4.5.2- Colheita das amostras	38
4.5.2.1- Técnica de colheita	38
4.5.3- Filtração e incubação	39
4.5.4- Contagem das colónias	39
4.5.5- Testes de confirmação	40
4.5.6- Contagem de colónias <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
5- Resultados e discussão	41
5.1- Implementação do método ISO 16266:2006	41
5.1.1- Resultados Implementação do método ISO 16266:2006	41
5.1.1.1- Resultado da contagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41

5.1.1.2- Critério de Precisão	43
5.1.1.3- Estimativa da Incerteza para a metodologia.....	45
5.1.2- Discussão de resultados	46
5.2.1- Resultado e discussão da pesquisa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em 10 fontes	48
5.2.1.1- Análise das placas.	48
5.2.1.2- Testes de confirmação	49
6- Conclusão	53
Bibliografia	55

Índice de Figuras

Figura 2.1- <i>Pseudomonas fluorescens</i> obtida através de microscopia eletrônica.	10
Figura.2.2- Ilustração (3D) gerada por computador de bactérias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistentes.	12
Figura 2.3- Colônias características de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em <i>Pseudomonas</i> agar base/ CN-agar- bioser	17
Figura 2.4- Teste de oxidase positivo.....	19
Figura 3.1- Logotipo e slogan da empresa SGS.....	21
Figura 5.1- Carta de duplicados correspondente às contagens de <i>Pseudomonas aeruginosas</i> , em 13 amostras, CP- Critério de Precisão e DR- amplitude.....	44
Figura 5.2- Verificação da fluorescência- colônias que cresceram na membrana de filtração em meio <i>Pseudomonas</i> Agar Base/CN	49
Figura 5.3- Colônias que se desenvolveram em F4, F5, F6 e F10 em meio <i>Pseudomonas</i> Agar Base/CN.....	49

Índice de Tabelas

Tabela 2.1- Agentes etiológicos e doenças associadas (<i>Ferreira et al.</i> , 2010)	5
Tabela 2.2- Informações gerais de agentes patogênicos transmitidos pela água potável (WHO, 2011).....	7
Tabela 2.3- Bactérias para as quais a transmissão através da água potável foi sugerida, mas a evidência é inconclusiva (WHO, 2011)	8
Tabela 2.4- Resumo dos fatores de virulência da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e a atividade biológica (Kipnis et al., 2006).	15
Tabela 4.1- Composição do meio <i>Pseudomonas</i> Agar Base da Oxoid	26
Tabela 4.2- Constituição suplemento <i>Pseudomonas</i> C-N Selective da Oxoid	26
Tabela 4.3- Composição do meio Plate Count Agar- da Bio Rad	27
Tabela 4.4 Composição do meio já preparado, King B da Bio Rad	28
Tabela 4.5- Composição do meio já preparado, Caldo de acetamida da Biokar Diagnostics	28
Tabela 4.6- Composição do reagente de Nesser, da Panreac-Applichem,.....	29
Tabela 4.7- Composição reagente oxidase da bioMérieux.....	29
Tabela 4.8- Equações para cálculo da Estimativa de Incertezas (ISO 29201:2012)	35
Tabela 4.9- Código das amostras, concelho de recolha e tipo de fonte	38
Tabela 5.1- Análise da contagem dos ensaios em duplicado para implementação da ISO 16266:2006.....	41
Tabela 5.2- Critério de Precisão, para os ensaios realizados em duplicado, para implementação da ISO 16266:2006	43
Tabela 5.3- Determinação da estimativa da Incerteza da metodologia.	45
Tabela 5.4- Resultado do cálculo da Estimativa de Incerteza	46
Tabela 5.5- Teste para <i>P. aeruginosa</i> em placas de “ <i>Pseudomonas</i> Agar Base/ CN-agar”, após a incubação.....	48
Tabela 5.6- Resumo dos resultados dos testes de confirmação	49

Lista de abreviaturas

CP- Critério de precisão

DL- Decreto Lei

ESAR- *European Society for translational Antiviral Research*

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana

HSE- *Health Service Executive*

IPAC- Instituto Português de Acreditação e Certificação

ISO- *Internacional Organization for Standartization*

LPS- Lipopolissacarídeo

NP- Norma Portuguesa

OMS- Organização Mundial de Saúde

ONU- Assembleia Geral das Nações Unidas

P. aeruginosa- Pseudomonas aeruginosa

PCA- *Plate Count Agar*

pH- Potencial de hidrogénio

RELACRE- Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal

SGS- *Société Générale de Surveillance*

UFC- Unidades Formadoras de Colónias

WHO- *World Health Organization*

1-Objetivo e Organização do trabalho

Pretende-se com este trabalho a implementação interna no laboratório de microbiologia da SGS, de uma metodologia para contagem de *Pseudomonas aeruginosa* em águas de consumo pelo método de filtração de membrana com aplicação da norma ISO 16266:2006 e posterior utilização dessa mesma metodologia para análise de águas de 10 fontes usadas potencialmente para consumo.

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria do género *Pseudomonas*, conhecida por ser um agente patogénico oportunista, associada a várias infeções principalmente em doentes imunodeprimidos (Stoler *et al.*, 2015; Wu, 2016). É uma bactéria Gram-negativa, em forma de bastonete, não produz esporos e é oxidase e catalase positivas. É capaz de crescer em águas com uma quantidade baixa de nutrientes, apresenta vários fatores de virulência, assim como resistência a antibióticos. Este agente patogénico tem uma distribuição oblíqua, podendo ser encontrado em solos, águas inclusive em sistemas de água potável, em alimentos e em meio hospitalar (Kouchesfahani *et al.*, 2015; Lyczak *et al.*, 2000).

De acordo com a norma ISO 16266:2006 não devem de estar presentes em águas de consumo.

Esta dissertação encontra-se organizada em seis capítulos. O primeiro capítulo, Objetivo e Organização do trabalho, pretende introduzir o tema da presente dissertação, definindo objetivos e a exposição geral da organização da mesma. No segundo capítulo, Enquadramento teórico, é apresentada a revisão bibliográfica de contextualização ao assunto do trabalho, os tópicos descritos são a água de consumo e agentes patogénicos presentes na água, *Pseudomonas* entre as quais *P. aeruginosa* e a descrição do conteúdo presente na norma implementada, a ISO 16266:2006. O terceiro capítulo contém a caracterização da empresa SGS e a organização do laboratório de microbiologia da SGS Portugal, local onde foi realizado o estágio. No quarto capítulo, Materiais e Métodos, são descritas as técnicas utilizadas, os meios de cultura e o procedimento experimental aplicado quer para a implementação interna da ISO 16266:2006, quer para a pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* em águas provenientes de 10 fontes. No capítulo cinco são apresentados os resultados e o tratamento estatístico dos mesmos, quando aplicável e a sua discussão. No capítulo seis são apresentadas as principais conclusões obtidas após a realização da implementação da metodologia e do estudo.

2-Enquadramento teórico

A água é essencial à vida, é um recurso imprescindível para a sobrevivência e o bem-estar da humanidade e para o equilíbrio dos ecossistemas (Ferreira *et al.*, 2010; HSE, 2008).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2010, a Assembleia Geral das Nações Unidas (ONU) reconheceu como um direito humano o acesso à água e ao saneamento, ou seja, todas as pessoas têm direito a água suficiente, contínua, segura e fisicamente acessível para uso pessoal e doméstico. Estando, a disponibilidade de água potável para consumo incondicionalmente ligada à sobrevivência de uma população (HSE, 2008).

De acordo com a OMS a água segura e de fácil acesso, para consumo é importante para a saúde pública, uma melhor qualidade da água, o seu abastecimento, saneamento e gestão podem conduzir a um crescimento económico e à redução da pobreza. A transmissão de doenças, como por exemplo, a cólera e diarreias, está associada a água contaminada e à falta de saneamento, estimando que 842000 pessoas morrem por ano devido a águas contaminadas.

É, portanto, necessário salvaguardar a qualidade e segurança da água de consumo definindo parâmetros, metodologia utilizada, intervalos de tempo de controlo e a gestão de perigos e riscos associados.

2.1-Água de consumo

De acordo com o decreto de lei, DL 306-2007, a água destinada ao consumo humano é definida como:

i) Toda a água no seu estado original, ou após tratamento, destinada a ser bebida, a cozinhar, à preparação de alimentos, à higiene pessoal ou a outros fins domésticos, independentemente da sua origem e de ser fornecida a partir de uma rede de distribuição, de um camião ou navio-cisterna, em garrafas ou outros recipientes, com ou sem fins comerciais;

ii) Toda a água utilizada numa empresa da indústria alimentar para fabrico, transformação, conservação ou comercialização de produtos ou substâncias, destinados ao consumo humano, assim como a utilizada na limpeza de superfícies, objetos e materiais que podem estar em contacto com os

alimentos, exceto quando a utilização dessa água não afeta a salubridade do género alimentício na sua forma acabada.

2.1.1-Qualidade microbiológica da água de consumo

A qualidade da água pode ser definida como o conjunto de características físicas, químicas e biológicas específicos para o fim a que se destina, é necessário definir parâmetros e estabelecer valores limites respeitando os quadros normativos, que tem como objetivo assegurar a saúde pública (Ferreira *et al.*, 2010). No caso da legislação portuguesa o decreto-lei que legisla os parâmetros e respetivo valor limite para águas de consumo é o DL 306-2007, de 27 agosto. Este estabelece o regime de qualidade de águas de consumo humano assim como os critérios de repartição da responsabilidade pela gestão de um sistema de abastecimento público de água para consumo humano.

Nas águas a qualidade microbiológica está profundamente relacionada com a população microbiana que se encontra presente, assim como os seus metabolitos e as suas interações, os seus efeitos que podem ser observados a nível ambiental, na saúde pública e noutros animais. Contudo os perigos e riscos mais significativos para a saúde humana, continuam a estar associados à ingestão de água contaminada com resíduos fecais de seres humanos ou outros animais de sangue quente. As fezes podem ser uma fonte de microrganismos patogénicos (bactérias, vírus, protozoários e helmintas), sendo estes a principal preocupação em relação à segurança microbiana (Ferreira *et al.*, 2010; WHO, 2011).

A água constitui um vetor de transmissão de organismos potenciadores de várias doenças (agentes patogénicos), isto é, suscetíveis de causar doenças. Muitas vezes, a qualidade microbiana varia de forma rápida e numa gama ampla o que potencia picos de concentração de microrganismos patogénicos e aumenta o risco de doenças e de situações epidémica ou endémica, para além de outros fatores, como as contaminações cruzadas ou de pessoa para pessoa, além disso quando a contaminação é detetada pode já ter sido expostos muitos indivíduos (Ferreira *et al.*, 2010; WHO, 2011). A tabela 2.1 apresenta de forma resumida, algumas bactérias patogénicas associadas à água assim como as doenças associadas e os sintomas primários.

De acordo com Ferreira *et al.*, a etiologia das doenças ligadas à água pode ser tipificada em três grandes grupos:

- Doenças ligadas à ingestão da água, causados por agentes patogénicos de origem fecal

- Doenças ligadas ao contato com a água, em especial de um uso inadequado para fins de higiene pessoal, em geral resultante de carências hídricas.
- Doenças resultantes do habitat hídrico e relacionado com a presença de vetores específicos.

Tabela 2.1- Agentes etiológicos e doenças associadas (Ferreira et al., 2010)

Agente etiológico	Doenças e sintomas primários
<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenterite (diarreia, febre, dor)
<i>Escherichia coli</i>	Gastroenterite (diarreia, vômito)
<i>E. coli</i> O157:H7	Gastroenterite (diarreia sanguínea severa, ausência de dor)
<i>Salmonella typhi</i>	Febre tifóide (diarreia ou obstipação, febre elevada, dor)
<i>Salmonella</i> spp.	Febres entéricas, gastroenterite, septicemia
<i>Shigella dysenteriae</i>	Disenteria (dor abdominal severa, diarreia aquosa)
<i>Shigella</i> spp.	Disenteria
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera (diarreia severa, desidratação)
<i>Yersinia</i> spp.	Gastroenterite aguda (diarreia)
<i>Leptospira</i> spp.	Doença de Weil (febre elevada, dor, icterícia, diarreia)
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastrite (náusea, dor, úlceras)
<i>Legionella</i> spp.	Doença respiratória aguda (febre, diarreia, tosse, dor)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infeções sistêmicas (urinário, respiratório, digestivo, dermatoses)
<i>Pseudomonas</i> spp.	Enterite necrótica, gangrena gasosa
<i>Clostridium perfringens</i>	Infeções sistêmicas (urinário, respiratório, digestivo, dermatoses)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gastroenterite (náuseas, vômito, dor abdominal)
<i>Staphylococcus</i> spp.	Infeções sistêmicas

2.1.2-Agentes patogénicos na água

De acordo com as Diretrizes para a qualidade da água potável, da OMS, os agentes patogénicos com origem na água possuem várias propriedades que os distinguem de outros contaminantes da água potável:

- Podem causar efeitos agudos e também crônicos para a saúde
- Alguns podem crescer no ambiente
- São discretos
- Estão muitas vezes agregados ou aderentes a sólidos em suspensão na água, e as suas concentrações variam no tempo, de modo que a probabilidade de adquirir uma dose infecciosa não pode ser prevista a partir da sua concentração média em água.
- A exposição que resulta em doença depende da dose, invasividade e virulência do patogénico, bem como do estado imune do indivíduo
- Se a infeção for estabelecida, os agentes patogénicos multiplicam-se no seu hospedeiro
- Alguns patogénicos transmitidos pela água têm a capacidade de crescer em alimentos, bebidas ou água quente aumentando a probabilidade de infeção
- Ao contrário de muitos agentes químicos os agentes patogénicos não apresentam efeito cumulativo

Como já foi referido os agentes patogénicos potencialmente transmitidos através da água de consumo contaminada são diversos e com diversas características, na tabela 2.2 encontram-se informações gerais acerca de bactérias patogénicas que são relevantes para a gestão do abastecimento de água potável. A implementação de um sistema de gestão integrado dos riscos, desde a origem até ao consumidor final, ou seja, a proteção das fontes, a seleção adequada dos tratamentos da água e a gestão dos riscos associados à distribuição irão diminuir em muito o risco de contaminação por parte de agentes patogénicos, que podem resultar na infeção simultânea de um elevado número de pessoas. Existem vários surtos associados ao tratamento inadequado, a uma manipulação incorreta da distribuição ocorrendo contaminações cruzadas, por exemplo, contaminação durante o armazenamento, pressão baixa e fornecimento intermitente de água (WHO, 2011; HSE, 2008).

Tabela 2.2 Informações gerais de agentes patogénicos transmitidos pela água potável (WHO, 2011)

Patogénicos	Espécie/ género/ grupo	Importância para a saúde	Persistência no abastecimento de água	Resistência ao cloro	Infectividade relativa	Fonte animal importante
Burkholderia	<i>B. pseudomallei</i>	Alta	Pode multiplicar-se	Baixo	Baixa	Não
Campylobacter	<i>C. coli</i>	Alta	Moderado	Baixo	Moderada	Sim
	<i>C. jejuni</i>					
Escherichia coli – Diarreica		Alta	Moderado	Baixo	Baixa	Sim
E.coli–Entero-hemorrágica	<i>E. coli</i> O157	Alta	Moderado	Baixo	Alta	Sim
Francisella	<i>F. tularensis</i>	Alta	Longo	Moderado	Alta	Sim
Legionella	<i>L. pneumophila</i>	Alta	Pode multiplicar-se	Baixo	Moderada	Não
Mycobacteria (não tuberculosas)	<i>Mycobacterium avium complex</i>	Baixa	Pode multiplicar-se	Alta	Baixa	Não
Salmonella typhi		Alta	Moderado	Baixo	Baixa	Não
Outras Salmonellae	<i>S. enterica</i>	Alta	Pode multiplicar-se	Baixo	Baixa	Sim
	<i>S. bongori</i>					
Shigella	<i>S. dysenteriae</i>	Alta	Curto	Baixo	Alta	Não
Vibrio	<i>V. cholerae</i> O1 e O139	Alta	Curto a longo	Baixo	Baixa	Não

Outros agentes patogênicos que podem estar naturalmente presentes no ambiente são capazes de causar doenças apenas em pessoas com o sistema imunológico comprometido ou em grupos vulneráveis, como idosos ou crianças. Se a água utilizada por essas pessoas para beber ou tomar banho contiver um número suficiente de microrganismos, estes podem produzir várias infecções da pele, mucosas do olho, orelha, nariz e garganta. Por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa* (WHO, 2011; HSE, 2008).

A tabela 2.3 contém informações sobre organismos que foram sugeridos como possíveis causas de doenças transmitidas pela água, mas onde a evidência não é conclusiva ou é inexistente (WHO, 2011).

Tabela 2.3 Bactérias para as quais a transmissão através da água potável foi sugerida, mas a evidência é inconclusiva (WHO, 2011)

Microrganismo	Espécie/ gênero/ grupo	Evidência de transmissão transmitida pela água (ou características epidemiológicas)	Presença e comportamento na água	Resistência ao cloro
<i>Acinetobacter</i>	<i>A. calcoaceticus baumannii complex</i>	Possível problema nas unidades de saúde (não gastrointestinal)	Comum e pode multiplicar-se	Baixa
<i>Aeromonas</i>	<i>A. hydrophila</i>	Os isolados clínicos não correspondem isolados ambientais	Comum e pode multiplicar-se	Baixa
<i>Enterobacter</i>	<i>E. sakazakii</i>	Infeção associada a fórmula para lactentes; nenhuma evidência de transmissão por via aquática	Improvável	Baixa
<i>Helicobacter</i>	<i>H. pylori</i>	Sugerido, mas nenhuma evidência direta; principal via de transmissão familiar	Detetado, sobrevive por tempo limitado	Baixa
<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Possível problema nas unidades de saúde (não gastrointestinal)	Pode multiplicar-se	Baixa

Tabela 2.3 Bactérias para as quais a transmissão através da água potável foi sugerida, mas a evidência é inconclusiva (WHO, 2011) (continuação)

Microrganismo	Espécie/ género/ grupo	Evidência de transmissão transmitida pela água (ou características epidemiológicas)	Presença e comportamento na água	Resistência ao cloro
<i>Leptospira</i>	<i>L. interrogans</i>	Não há evidência de transmissão através da ingestão de água potável. Principalmente transmitida através de contacto com água de superfície contaminada; surtos associados a inundações	Pode sobreviver meses na água	Baixa
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Possível problema nas unidades de saúde (não gastrointestinal)	Comum e pode multiplicar-se	Moderada
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i>	Não há evidência de transmissão através de água potável; as mãos são a fonte mais importante	Comum e pode multiplicar-se	Moderada
<i>Tsukamurella</i>	<i>T. paurometabola</i>	Possível problema nas unidades de saúde (não gastrointestinal)	Comum e pode multiplicar-se	Desconhecida
<i>Yersinia</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	Espécies detetadas em água provavelmente não patogénica; comida é a fonte primária	Comum e pode multiplicar-se	Baixa

2.2-Pseudomonas

O género das *Pseudomonas* é um dos grupos de bactérias mais diversos e ecologicamente mais significativos no planeta, devido à sua longa história evolutiva, segundo o estudo de Vaz-Moreira e colaboradores (2012), as *Pseudomonas* foram observadas desde o início da história da microbiologia, devido à sua presença generalizada na natureza (Cornelis, 2008).

O fenótipo do género *Pseudomonas* tem a forma de bacilo, Gram-negativos, aeróbio (embora em alguns casos, o nitrato possa ser usado como aceitador de eletrões, em condições anaeróbias), não formam esporos, o diâmetro das células varia entre 0,5-1 µm e o comprimento entre 1,5 a 5 µm, são móveis através de um ou mais flagelos polares, em algumas bactérias deste género podem formar-se flagelos laterais mais curtos. São oxidase positiva, algumas espécies produzem pigmentos, conseguem metabolizar várias fontes de carbono. A maioria das espécies não se desenvolvem a pH menor que 4,5 e são bactérias mesófilas, ou seja, tem o crescimento ótimo entre 25 °C e os 40 °C, contudo existem espécies que podem crescer a 44 °C (algumas estirpes de *P. aeruginosa*) e outra a 4 °C (*P. fluorescens*) (Cornelis, 2008; Mena e Gerba, 2009). Na figura 2.1 é apresentada uma imagem de microscopia eletrónica de *P. fluorescens*.

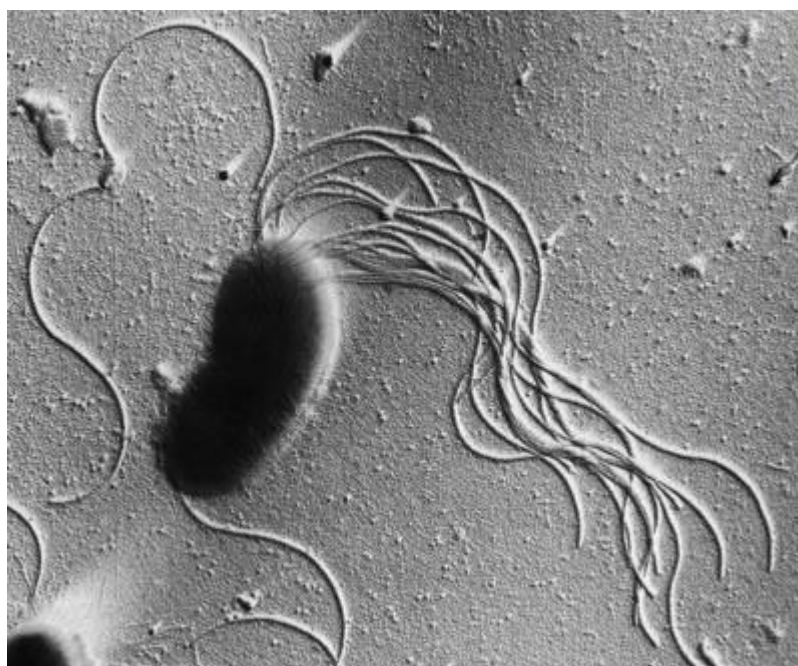


Figura 2.1- *Pseudomonas fluorescens* obtida através de microscopia eletrónica. Adaptado de. https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/gallery/Low_Angle_Rotary_Shadowed_TEM.aspx

Estão presentes principalmente no solo, na água salgada e também na água doce, podem, portanto, adaptar-se a vários habitats e até conseguem crescer em água destilada (Mena e Gerba, 2009).

O género *Pseudomonas* tem como característica a sua vasta adaptabilidade devido ao fato de serem microrganismos prototróficos, à sua versatilidade metabólica, a uma plasticidade genómica e a capacidade de reagirem a situações de stress (a compostos químicos e antibacterianos), justificando assim a sua presença numa diversidade de ambientes terrestres e aquáticos. Podendo representar algumas preocupações para a saúde pública uma vez que inclui espécies do género *Pseudomonas*

consideradas agentes patogénicos, quer em humanos quer em animais, sendo a transmissão feita na sua maioria por contaminação, por exemplo através da água (Vaz-Moreira *et al.*, 2012).

Várias espécies de *Pseudomonas* foram associadas a doenças humanas como por exemplo, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo esta última a mais significativa como agente patogénico humano, podendo causar infeções graves em indivíduos imunodeprimidos e raramente em indivíduos saudáveis. (Mena e Gerba, 2009; Vaz-Moreira *et al.*, 2012)

2.2.1- *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.1.1- Descrição geral

Pseudomonas aeruginosa pertence à ordem Pseudomonadales, família Pseudomonadaceae, e ao género *Pseudomonas*.

É uma bactéria Gram-negativa, em forma de bacilo, com 1,5 a 5,0 µm de comprimento, não produz esporos, produz vários pigmentos entre os quais estão um pigmento azul-esverdeado piocianina e/ou um pigmento fluorescente pioverdina. (Kouchesfahani *et al.*, 2015; Lyczak *et al.*, 2000). É aeróbia, contudo pode crescer através de respiração anaeróbia, em que tem como aceitador de eletrões, p.e. o nitrato (Lau, 2004), é catalase e oxidase positivas, produz amónia e consegue crescer com o citrato como única fonte de carbono. A maioria das estirpes de *P. aeruginosa* são móveis através de um único flagelo (WHO, 2011). Na figura 2.2 uma ilustração de *Pseudomonas aeruginosa*, baseada em imagens de microscopia eletrónica de varrimento, é possível visualizar o flagelo único e os pili que constituem importantes fatores de virulência.

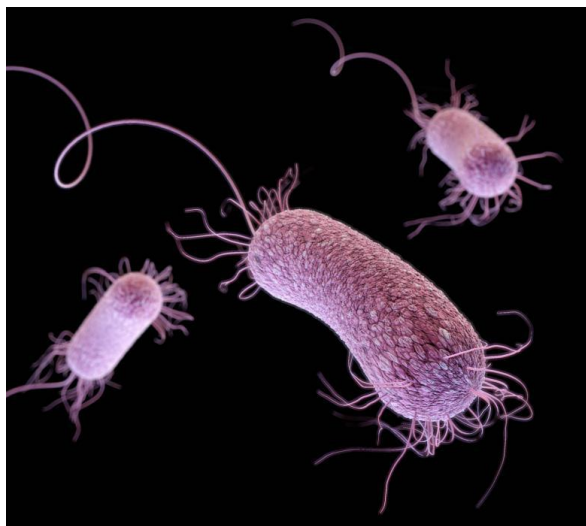


Figura.2.2-Ilustração (3D) gerada por computador de bactérias *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes. Baseada em imagens de microscopia eletrônica de varrimento. ID#:16876 de Archer J. (2013). Adaptado de <https://phil.cdc.gov/phil/details.asp>

Pseudomonas aeruginosa é a espécie mais virulenta do gênero *Pseudomonas* (Ngwa *et al.*, 2017), sendo um patógeno bacteriano invasivo e oportunista, encontrado em diversos ambientes e pode causar infecções nosocomiais severas e uma série de infecções sistêmicas humanas, incluindo endocardite, osteomielite, pneumonia, infecções do trato urinário, infecções gastrointestinais, meningite e septicemia em indivíduos imunodeprimidos, crianças, internados hospitalares e idosos (Stoler *et al.*, 2015; Wu, 2016).

A bactéria *P. aeruginosa* não é um habitante usual do trato intestinal, contudo é excretada por 12% da população (Ferreira *et al.*, 2010) e é frequentemente monitorada como um indicador de outros contaminantes bacterianos de origem fecal (Stender, 2000).

Possui uma variedade de fatores de virulência que são principalmente responsáveis pela sua patogenicidade, como pili, flagelos, lipopolissacarídeo (LPS), proteases, exotoxina A e outras exoenzimas (Wu, 2016, Lyczak *et al.*, 2000).

Como *P. aeruginosa* exibe uma versatilidade metabólica extremamente alta e adapta-se a uma variedade de condições, consegue sobreviver em vários tipos de habitats, uma das suas características particulares é a capacidade de crescer em ambientes com poucos nutrientes e sobreviver por longos períodos de carência nutritiva, estando muitas vezes relacionadas com a formação de biofilmes (Suzuki *et al.*, 2013; Legnani *et al.*, 1999; Casanovas- Massana *et al.*, 2010). Além de mecanismos mais tradicionais, a extraordinária adaptabilidade de *P. aeruginosa*, incluindo as suas habilidades para colonizar múltiplos nichos ambientais e utilizar vários compostos como fonte de energia, sobrevive em

condições de stress ambiental, incluindo a exposição a antibióticos que pode levar ao desenvolvimento de resistência adaptativa a antibióticos (Breidenstein *et al.*, 2011; Lyczak *et al.*, 2000).

É uma das principais causas de infecções hospitalares com alta taxa de mortalidade (Kouchesfahani *et al.*, 2015), contudo é de evidenciar que a doença humana que lhe é atribuída é bastante rara em indivíduos saudáveis, uma vez que os seres humanos saudáveis conseguem neutralizar efetivamente o processo infeccioso através do sistema imune inato (Lyczak *et al.*, 2000).

A capacidade da *P. aeruginosa* de crescer em água mineral com concentrações baixas de compostos orgânicos e sólidos dissolvidos (Legnani *et al.*, 1999), é uma questão preocupante a nível das contaminações. Revisões recentes da literatura relataram uma ligação entre a contaminação do sistema de água e as infecções por *P. aeruginosa*. No entanto, embora exista suspeita de uma ligação entre a contaminação da rede de água e a infecção associada à saúde, a força da associação ainda não é clara (Lefebvre *et al.*, 2017).

2.2.1.2-Importância Médica e efeitos na saúde humana

A maioria das infecções por *Pseudomonas* resulta do contato ou uso de fluido contaminados, como água, sangue e desinfetantes no ambiente médico (Mena e Gerba, 2009). Acredita-se que as infecções por *Pseudomonas aeruginosa*, assim como por outros agentes patogênicos, tenham como fonte mais significativa a água, contribuindo para infecções graves em ambientes de cuidado de saúde (Gerba, 2015).

As *Pseudomonas aeruginosa* têm sido um adversário tão complexo devido à sua capacidade de desenvolver resistências a antibióticos, formar biofilmes impenetráveis e libertar um grande arsenal de fatores de virulência. (Lau *et al.*, 2004). Deste modo este organismo juntou-se à lista de "superbactérias" em virtude da sua aptidão para criar resistência, e como tal é muito difícil de erradicar (Breidenstein *et al.*, 2011).

As infecções por *P. aeruginosa* foram associadas a uma alta taxa de incidência de doença e sua taxa de mortalidade foi relatada de 20 a 60% nas infecções adquiridas no hospital (Gholami *et al.*, 2017).

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno versátil oportunista associado a um amplo espectro de infecções em seres humanos. A lista de infecções associadas a esta bactéria é ampla e continua a crescer. As infecções mais graves de *P. aeruginosa* são observadas em ambientes de cuidados de saúde e incluem bacteriemia, infecções do sistema respiratório, infecções do trato urinário e infecções de feridas, incluindo infecção secundária em queimaduras principalmente em grupos de risco, como indivíduos imunodeprimidos, com fibrose cística, com cancro, infectados com HIV, idosos e prematuros (Da Silva *et al.*, 2008; Kerr e Snelling, 2009; Mena e Gerba, 2009).

Como já foi referido, a *Pseudomonas aeruginosa* forma biofilmes permitindo a persistência destes microrganismos em sistemas de água por longos períodos, esta é uma explicação do fato das taxas de colonização de sistemas de água serem tão elevadas em sistemas de saúde, e as infecções nosocomiais de *P. aeruginosa* devido à contaminação de uma fonte de água potável (Costa *et al.*, 2015). Contudo para que a infecção por *P. aeruginosa* proveniente de sistemas de água hospitalares ocorra, o organismo deve primeiro ser transferido para o paciente e depois chegar a um local onde pode estabelecer colonização, a pele intacta não oferece essas condições, sendo as feridas e as mucosas mais propensas a serem contaminadas (Garvey *et al.*, 2017).

2.2.1.3- Fatores de virulência

Um estudo de Kipnis e colaboradores em 2006, descreveu os mecanismos patogênicos de *Pseudomonas aeruginosa*, de forma resumida a ação desta bactéria como agente patogênico em doentes com estados predisponentes como fibrose cística, ventilação mecânica, imunodeficiência ou doenças respiratórias pré-existentes. Os flagelos e pili, são apêndices, sobre a superfície móvel de *P. aeruginosa* responsáveis pela motilidade bacteriana e pela progressão no contato epitelial, facilitam também o contato com as células epiteliais, ligando-se ao glicolípido *asialo* gangliósido M1 (aGM1), o lipopolissacárido (LPS) interage com aGM1 provocando uma maior adesão bacteriana, conseguindo uma adesão irreversível, sendo um passo crítico. Após esta adesão, o sistema de secreção tipo III é ativado, permitindo que o agente patogênico injete toxinas diretamente no citoplasma eucariótico. São conhecidas quatro proteínas, ExoY, ExoS, ExoT e ExoU, que participam na citotoxicidade da bactéria, conduzindo à invasão e dispersão da *Pseudomonas aeruginosa*. Outros fatores de virulência são segregados por sistemas do tipo II no espaço extracelular, como a elastase, a fosfatase alcalina, exotoxina A e outros descritos na tabela 2.4, apresentada em forma de resumo.

Tabela 2.4 Resumo dos fatores de virulência da *Pseudomonas aeruginosa* e a atividade biológica (Kipnis et al., 2006).

Fator de virulência	
Flagelo	Adesão às células epiteliais, ligando-se a <i>asialo</i> GM1. Provoca resposta inflamatória e está relacionado com a produção de IL-8.
Pili	Crucial para a fase de adesão da colonização, liga-se à <i>asialo</i> GM1 da membrana das células epiteliais.
LPS	Ativa múltiplas vias pró-inflamatórias. Maior adesão através da interação com <i>asialo</i> GM1
Alginato	Funciona como uma adesina, ancorando a <i>P. aeruginosa</i> ao epitélio respiratório colonizado. Quando sobreexpresso protege a bactéria da fagocitose e de antibióticos. Importante na estabilidade dos biofilmes.
Piocianina	Aumento da concentração de IL-8. Deprime a resposta do hospedeiro. Induz a apoptose dos neutrófilos. Inativa a catalase das células epiteliais respiratórias.
Pioverdina	É um composto sideróforo. Regula a secreção de outros fatores de virulência.
Protease alcalina	Provoca lesões nos tecidos. Inibe a atividade dos neutrófilos. Inativação IgG.

Tabela 2.4 Resumo dos fatores de virulência da *Pseudomona aeruginosa* e a atividade biológica (Kipnis et al., 2006) (continuação)

Fator de virulência	
Protease IV	Provoca lesões nos tecidos. Degrada proteínas imunológicas (IgG) e proteínas que se liguem ao Ferro.
Elastase	Provoca lesões nos tecidos destrói elastina e colagénio, inibe a atividade dos neutrófilos. É pró-inflamatória, aumenta os níveis de IL-8.
Fosfolipase C	Provoca a hematólise. Degrada lípidos e a lectina, facilitando a destruição dos tecidos.
Exotoxina A	Inibe a síntese de proteínas, levando à morte celular. Inibe a resposta do hospedeiro à infeção.
ExoS	Ativa a proteína GAP (proteínas ativadoras de GTPase). Altera a organização do citoesqueleto. Modula a resposta imune e inflamatória do hospedeiro.
ExoT	Efeito semelhante a ExoS no citoesqueleto eucariótico. Inibe a fagocitose como a resposta de cicatrização.
ExoY	Aumenta o cAMP citosólico, levando ao aumento do GAP intercelular e ao aumento da permeabilidade celular.
ExoU	Tem atividade de fosfolipase, que rompe a membrana celular eucariótica. É responsável pela descompartimentação da resposta inflamatória.

Quando existe uma infeção aguda há uma supremacia da invasão, disseminação e dano dos tecidos, contudo em infeções crónicas, *Pseudomonas aeruginosa* pode adaptar-se perdendo os pili e flagelo, evitando a ação do sistema imunitário do hospedeiro, e formando biofilmes. Neste tipo de infeções é mantido um estado de inflamação constante, devido a fatores de virulência extracelulares. *P. aeruginosa* possui muitos sistemas reguladores e de sinalização (deteção de quórum), que resultam numa produção coordenada dos fatores de virulência e no caso de infeções crónicas de produção do biofilme (Kipnis et al., 2006).

2.3-Norma ISO 16266.2006- Qualidade da água- Detecção e enumeração de *Pseudomonas aeruginosa*- método por filtração de membrana

A norma ISO 16266:2006 é específica para o isolamento e enumeração de *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de água engarrafada pela técnica de filtração de membrana, contudo este método pode também ser aplicado a outros tipos de água com uma flora microbiana baixa, como por exemplo águas de piscina e água de qualidade adequada ao consumo humano.

Para águas naturais minerais é aconselhado a filtração de 250 mL, para outro tipo de amostras normalmente são examinados 100 mL.

Esta metodologia (16266:2006) tem por princípio a pesquisa e contagem de colónias de *P. aeruginosa*, após filtração de determinado volume de água através de uma membrana de 0,45 µm de porosidade, e incubação a 36±2 °C durante 44±4 horas na superfície do meio seletivo, “*Pseudomonas* Agar Base/ CN-agar”.

Após o período de incubação, verifica-se o desenvolvimento de colónias características, colónias achatadas, com diâmetros de 0,08 a 0,22 mm aproximadamente, cor verde/azulada (indica a produção de piocianina), como se pode verificar na figura 2.3 e de colónias não características (colónias castanho avermelhado ou colónias fluorescentes que não sejam nem verdes nem azuis).

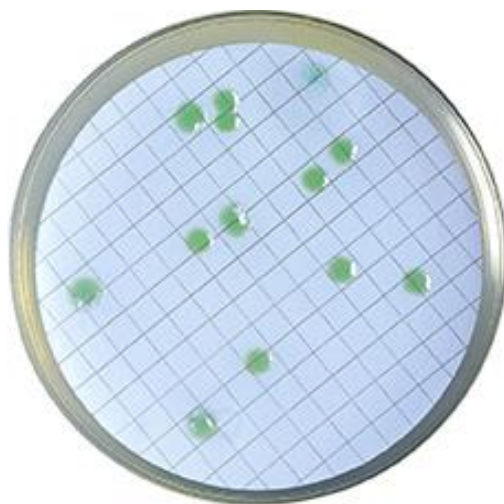


Figura 2.3- Colónias características de *Pseudomonas aeruginosa* em *Pseudomonas* agar base/ CN-agar- bioser Adaptado de <http://www.bioser.com/en/p/1159/cn-agar-para-pseudomonas/>

Esta verificação da presença de colónias características e não características deverá ser realizada depois de 22 ± 2 horas de incubação a 36 ± 2 °C e caso ainda não exista crescimento celular novamente às 44 ± 4 horas. Realizando-se também a verificação através de ensaio com iluminação UV.

O número de colónias presumivelmente *Pseudomonas aeruginosa* são obtidas pela contagem de colónias características na membrana de filtração após incubação. Colónias produtoras de piocianina (verdes/ azuis) são consideradas como *Pseudomonas aeruginosa* confirmadas, porém outras colónias fluorescentes ou com cor castanho-avermelhado requerem confirmação.

As colónias castanhas avermelhadas não fluorescentes necessitam de confirmação em Caldo de Acetamina, teste de oxidase, teste de Fluorescência em meio KING B (neste meio é testada a capacidade de síntese de um outro pigmento, pioverdina) e as fluorescentes não produtoras de piocianina necessitam de confirmação em Caldo de Acetamina para verificação da presença de amónia.

2.3.1- Confirmação de colónias não características

Esta confirmação é feita primeiramente pela inoculação dos dois tipos de colónias não características (fluorescentes não produtoras de piocianina e não fluorescentes castanhas avermelhadas) em PCA ou outro meio nutritivo a 36 ± 2 °C durante 22 ± 2 horas.

2.3.1.1- Castanhas avermelhadas não fluorescentes

2.3.1.1.1- Teste de oxidase

Após purificação das colónias em meio PCA, realizar este teste às colónias não características de coloração castanho avermelhada. É esperado que ao fim de 10 segundos se verifique o aparecimento de uma coloração azul escura, indicando uma reação positiva (figura 2.4). Estas colónias procedem com a sua confirmação em meio KING B.

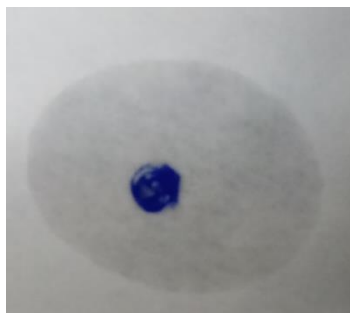


Figura 2.4- Teste de oxidase positivo

2.3.1.1.2- Fluorescência- Meio KING B

Neste meio de cultura irá ser pesquisado um pigmento específico: a pioverdina, cuja síntese se deve à presença de sulfato de magnésio no meio. A pioverdina é responsável pela coloração amarelo esverdeada do meio.

Inocular as colónias provenientes do PCA no meio KING B (o meio tem de estar solidificado em posição inclinada), e incubar a 36 ± 2 °C durante 24 horas a 5 dias.

Verificar diariamente, sob luz UV, a presença de fluorescência, indicadora de pioverdina. Estas colónias procedem a sua confirmação em Caldo de Acetamida.

2.3.1.1.3- Produção de Amónia- Caldo Acetamina e Reagente de Nessler

Inocular as colónias provenientes do PCA em tubos com 5 mL de Caldo de Acetamida, e incubar a 36 ± 2 °C durante 21 ± 2 horas. Posteriormente, adicionar 1 a 2 gotas de reagente de Nessler para verificação da produção de amónia, caracterizada pela presença de uma coloração que pode variar entre o amarelo e a cor de tijolo dependendo da sua concentração.

2.3.1.2- Fluorescentes não produtoras de piocianina

2.3.1.2.1- Produção de Amónia- Caldo Acetamina e Reagente de Nessler

Inocular as colónias provenientes do PCA em tubos com 5 ml de Caldo de Acetamida, e incubar a 36 ± 2 °C durante 21 ± 2 horas. Posteriormente, adicionar 1 a 2 gotas de reagente de Nessler para verificação da produção de amónia, caracterizada pela presença de uma coloração que pode variar entre o amarelo e a cor de tijolo dependendo da sua concentração.

2.3.2-Contagem de colónias *Pseudomonas aeruginosa*

São consideradas como *Pseudomonas aeruginosa*, todas as colónias com cor verde/ azulada, todas as colónias castanho-avermelhadas que são oxidase positiva, produtoras de fluorescência e amónia a partir de acetamida e todas as colónias fluorescentes, que não são nem azuis nem verdes, que produzem amónia.

3-Characterização da empresa

A Empresa SGS é uma empresa líder mundial em inspeção, verificação, testes e certificação que atua em vários sectores desde agricultura e alimentação, automóvel, químico, construção, energia, industrial, ciências biológicas, logística, entre outros.

A empresa foi fundada na cidade de Rouen em França, em 1878 teve como origem a inspeção dos carregamentos de grãos, e ainda hoje é líder deste sector que surgiu na necessidade de proteger o exportador. A empresa passou por vários momentos, atravessou e sobreviveu a vários fatores históricos como a primeira Guerra, que ditaram também o sucesso desta. A sede em 1915 foi mudada de Paris para Genebra na Suíça, em 1919 muda o nome para o que tem atualmente, Société Générale de Surveillance. A rede SGS é composta por mais de 2.000 escritórios e laboratórios e mais de 90.000 funcionários em todo o mundo. A figura 3.1 mostra o logotipo e o slogan atual da empresa.



Figura 3.1 Logotipo e slogan da empresa SGS

Em 1922 o Grupo SGS fundou a SGS Portugal, inicialmente dedicada ao controlo de operações de carga e descarga de cereais, foi sendo alargada a vários setores, acompanhando as mudanças e exigências do mercado. Atualmente abrange serviços como auditoria, certificação, consultoria, inspeção, outsourcing, análise e ensaios, formação e verificação nos mais diversos ramos. A sede determinou que a filial portuguesa teria de desenvolver a sua atividade pelos mesmos princípios geradores da ação do grupo: a Independência, a Integridade, a Confidencialidade e a Inovação. Apostando numa equipa altamente qualificada, a SGS tem mais de 200 colaboradores diretos em Portugal e uma extensa bolsa de especialistas externos com total cobertura geográfica nacional.

O Grupo SGS Portugal detém diversas competências que, por uma questão de maior eficiência na Gestão da Qualidade, foram agrupadas no SGS MULTILAB. O SGS MULTILAB é constituído por: Laboratório de Análises Físico-Químicas, Microbiológicas e Amostragem; Laboratório de Ensaios de Ambiente e Segurança; Laboratório de Ensaios Não Destrutivos. Está localizado no Pólo Tecnológico de Lisboa, é um dos mais modernos laboratórios do país. Possui laboratórios acreditados nas áreas agroalimentar, detergentes, produtos de higiene, cosméticos, dispositivos médicos, ensaios não destrutivos, ambiental e segurança ocupacional.

O Laboratório de Ensaios Físico-Químicos, Microbiológicos e Amostragem da SGS Portugal é, como já referido, um dos mais modernos laboratórios do país. Para o reconhecimento e para a aceitação dos resultados, a Acreditação é essencial, estando acreditado desde 1992 de acordo com a norma NP EN ISO/IEC 17025, é de referir que foi um dos primeiros laboratórios privados em Portugal acreditado nesta área. Não obstante a equipa qualificada, técnicos competentes e formados que promove os bons resultados e crescimento.

O Laboratório de Ensaios Físico-Químicos, Microbiológicos e Amostragem, compreende:

- Laboratório de análises microbiológicas para produtos alimentares, águas, ambiente, detergentes, produtos de higiene (DPH) e cosméticos e dispositivos médicos;
- Laboratório de ensaios físico-químicos com competência para análises a produtos alimentares e águas, estando equipado para dar resposta de forma automática a cerca de 80% das suas análises de rotina;
- Laboratório de ensaios físico-químicos para análises a DPH;
- Rede de técnicos especializados para a recolha e transporte de amostras em Portugal Continental e Ilhas, estando a amostragem incluída no âmbito da acreditação;
- Área especializada em apreciação técnica de rotulagem e apoio no cumprimento da legislação em vigor.

O estágio foi realizado no Laboratório de Ensaios Físico-Químicos, Microbiológicos e Amostragem, no laboratório de microbiologia.

3.1- Laboratório de microbiologia

O laboratório da SGS Portugal é um laboratório acreditado, respeitando, portanto, todos os requisitos necessários descritos na NP/ISO 17025:2005- Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração. Existem vários fatores que determinam a exatidão e fiabilidade dos ensaios e/ou calibrações entre os quais: fatores humanos, métodos de ensaio e calibração e validação de métodos, equipamento, rastreabilidade das medições, a amostragem, manuseamento de itens a ensaiar e calibrar e também as instalações e condições ambientais. Por esse motivo o laboratório de Microbiologia da SGS Portugal está construído com as áreas do laboratório de acordo com o princípio

da "marcha em frente" (Guia Relacre6,2007), evitando a contaminação das amostras e contaminações cruzadas.

O laboratório de Microbiologia, é composto por sete áreas diferentes, sendo:

- **Receção e Registo de Amostras:** área onde as amostras são recebidas e registadas, com um código de referência interno. As normas de trabalho também saem desta sala (o que o cliente pretende).
- **Sala de preparação de meios de cultura e esterilização de material:** área onde todos os meios de cultura que necessitam de serem preparados são preparados, assim como a esterilização dos que necessitam, da água e do material limpo.
- **Sala de preparação das amostras (Micro Box):** local onde as amostras que necessitam de preparação são pesadas e diluídas, com solvente próprio, em rigorosas condições de assepsia.
- **Sala de análises:** existem duas câmaras de fluxo laminar onde são feitas as análises e é nesta sala que se encontra o Robô de inoculação de placas automatizado- Kitty. São realizadas as diluições necessárias aos procedimentos. É nesta área que se realizam as filtrações das amostras de água. Antes de serem realizados os procedimentos, são feitas as marcações necessárias (número de amostra, diluição e meio) conforme as indicações das normas de trabalho (boletim de análise).
- **Sala de estufas:** área onde de encontram várias estufas, a diferentes temperaturas, para incubação das amostras inoculadas e dos meios já preparados. O tempo de incubação depende do microrganismo/ meio de cultura, o que se encontra estabelecido em normas e procedimentos internos.
- **Sala de contagem e repicagens:** depois da incubação, são analisados os resultados, as colónias das placas de Petri incubadas são contadas em Unidades Formadoras de Colónias (UFC), os resultados são registados. Existem amostras que necessitam de ser repicadas para meios específicos/ seletivo, outras necessitam de testes de confirmação. A filtração de águas para análise de *Legionella* também é realizada nesta área.
- **Sala de descontaminação lavagem do material:** área onde todo o material utilizado no laboratório de microbiologia é lavado, onde se dá a descontaminação das amostras contaminadas e do material que entra em contato com estas.

4- Materiais e Métodos

Neste capítulo está descrito os métodos instrumentais utilizados para a concretização do trabalho experimental de acordo com a norma 16266:2006 “Water quality- Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*- Method by membrane filtration”. Na vertente experimental foram utilizadas duas aplicações da mesma técnica, primeiramente a implementação do método descrito na norma seguindo-se a análise de águas de 10 fontes da periferia de Lisboa para verificação da presença de *Pseudomonas aeruginosa*.

4.1-Método de Filtração por membrana

O método de filtração por membrana, está fundamentado na filtração de volumes adequados de água, por meio de pressão negativa, utilizando membrana de filtração com porosidade tal que possibilita que as bactérias fiquem retidas na sua superfície. A membrana é transferida para uma placa de Petri, contendo o meio seletivo para o microrganismo em estudo. O meio de cultura difunde-se por capilaridade de membrana, entrando em contacto com os microrganismos que ficaram retidos no filtro após um período de incubação. A seletividade do meio permite o crescimento de colónias típicas de acordo com o microrganismo que está a ser pesquisado, com características quer morfológicas e de cor, assim como por exemplo fluorescência. Os resultados são expressos em unidades formadora de colónias (UFC/100mL), resultado da contagem das colónias típicas.

A técnica do operador é muito importante para a realização deste método, uma vez que não pode existir contaminação das membranas, quer na transferência para a rampa de filtração, quer para as placas. O material deve ser todo esterilizado, para cada amostra, tendo de existir um cuidado maior com as pinças.

4.2- Reagentes

4.2.1- Meio de cultura seletivo para *Pseudomonas aeruginosa*

O meio utilizado para a quantificação do microrganismo em estudo foi o CM0559 *Pseudomonas* Agar Base da Oxoid, cuja composição se encontra na tabela 4.1. A preparação do meio foi realizada

de acordo com as instruções da embalagem, foram pesados 24,2 g de pó, este foi dispensado em 500 ml de água fria desionizada e adicionados 5 ml de glicerol (G7893- SIGMA-ALDRICH).

Foi aquecido até a ebulição para dissolver completamente, seguiu-se a distribuição para um frasco de 500 ml e a esterilização em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Depois de se retirar do autoclave, deixou-se arrefecer até aproximadamente aos 50 °C e adicionou-se assepticamente o frasco de suplemento *Pseudomonas* C-N Selective SR0102E da Oxoid (tabela 4.2), anteriormente reconstruído em 2 ml de etanol/ água destilada esterilizada, na proporção de 1:1.

Agitou-se para misturar completamente e foi distribuído em Placas de Petri.

Tabela 4.1- Composição do meio Pseudomonas Agar Base da Oxoid

Constituintes	Concentração (g/L)
Peptona de gelatina	16,0
Hidrolisado de caseína	10,0
Sulfato de potássio	10,0
Cloreto de magnésio	1,4
Agar	11,0

Tabela 4.2- Constituição suplemento Pseudomonas C-N Selective da Oxoid

Constituintes	Massa (mg)
Cetrimida	110,0
Nalidixato Sódico	7,5

Após a solidificação do meio, este apresenta um aspeto de gel transparente e amarelado, o pH deverá ser $7,1 \pm 0,2$ a 25 °C. As placas são armazenadas no frigorífico 5 ± 3 °C, tendo uma validade de 7 dias.

4.2.2- Meio nutritivo PCA agar

Meio nutritivo não seletivo utilizado para o isolamento e crescimento de colônias para efetuar os testes de confirmação foi o meio Plate Count Agar- 3564475 da Bio Rad. Para a preparação do meio foram dissolvidos 20,5 g de pó num litro de água desionizada até obtenção de uma suspensão homogênea, seguindo-se o aquecimento lento mexendo com frequência. Deixou-se chegar à ebulição até estar completamente dissolvido. Foi distribuído em frascos de 500 mL e esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 min. Segue-se a tabela 4.3 com a composição do meio.

Tabela 4.3- Composição do meio Plate Count Agar da Bio Rad

Constituintes	Concentração (g/L)
Digestão enzimática da caseína	5,0
Extrato de levedura	2,5
Glucose	1,0
Agar	12,0

Após a solidificação do meio, este apresenta um aspeto de gel amarelo claro, o pH deverá ser $7,0 \pm 0,2$ a 25 °C. As placas são armazenadas no frigorífico 5 ± 3 °C e tem uma validade de 7 dias.

4.3- Meios e reagentes para testes de confirmação

4.3.1- Meio King B

O meio utilizado para o teste de confirmação de produção de fluorescência pela *Pseudomonas aeruginosa*, foi o meio já preparado, King B 55278 da Bio Rad. Este meio aumenta a síntese de pioverdina, um pigmento produzido por *Pseudomonas aeruginosa* e por outras espécies de *Pseudomonas*.

A constituição do meio será apresentada na tabela seguinte por litro

Tabela 4.4 Composição do meio já preparado, King B da Bio Rad

Constituintes	Quantidade
Peptona	20,0 g
Glicerol	10,0 mL
Fosfato de dipotássio	1,5 g
Sulfato de magnésio heptahidratado	1,5 g
Agar	15,0

O meio sólido tem um aspeto de gel amarelo claro ligeiramente opaco, o pH deverá ser $7,2 \pm 0,2$ a 25 °C. Os tubos são armazenados no frigorífico 5 ± 3 °C.

4.3.2- Caldo acetamida

O meio utilizado para o teste de confirmação de produção de amónia para *Pseudomonas aeruginosa*, foi o meio já preparado de designação, Caldo de acetamida BM09508 da Biokar Diagnostics.

A constituição do meio será apresentada na tabela 4.5.

Tabela 4.5 Composição do meio já preparado, Caldo de acetamida da Biokar Diagnostics

Constituintes	Concentração (g/L)
Acetamida	2,0
Sulfato de magnésio	0,2
Fosfato de monopotássio	1,0
Molibdato de sódio	5,0
Sulfato de ferro	0,5
Cloreto de sódio	0,2

O meio líquido obtido é incolor e translúcido, com um pH de $7,0 \pm 0,5$ a 25°C . Os tubos são armazenados no frigorífico $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

4.3.3- Reagente Nesser

Reagente de Nesser utilizado para a confirmação da produção de amónia foi o reagente com a referência 171581.1209 da Panreac-Applichem, com a composição apresentada na tabela 4.6:

Tabela 4.6 Composição do Reagente de Nesser, da Panreac-Applichem,

Constituintes	Concentração (g/L)
Iodeto de mercúrio (II)	100,0
Iodeto de potássio	70,0
Hidróxido de sódio	160,0

O reagente líquido, com cor amarela transparente, é miscível com água e apresenta um pH de 13.

4.3.4- Reagente oxidase

O reagente utilizado para realizar o teste de oxidase, foi o reagente já preparado, reagente oxidase com a referência 55635 da bioMérieux. A composição será apresentada na tabela 4.7:

Tabela 4.7-Composição reagente oxidase da bioMérieux

Constituintes	Concentração (g/L)
N,N,N,N-tetrametil-1,4-fenilenediamina	10,0
Ácido ascórbico	2,0

O reagente é incolor a amarelo pálido. A conservação deve ser feita entre 18°C a 25°C .

4.4- Procedimento experimental para a implementação do método ISO 16266:2006

Depois da preparação das amostras foram filtradas 18 amostras e 1 branco em duplicado. A parte experimental foi realizada na sala de contagem e repicagem em camara de fluxo laminar vertical.

Para a implementação e validação do método foram contemplados vários fatores. Os fatores são a validação do método de acordo com as normas internas, de pelo menos 10 resultados positivos, a qualificação dos analistas com base na avaliação de ensaios Interlaboratoriais e realização de ensaios em paralelo para o estabelecimento das Incertezas, que fazem parte também do controlo de qualidade para este método, assim como o Critério de Precisão.

4.4.1- Preparação de *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12903

O microrganismo utilizado ao longo do trabalho experimental de implementação do método foi a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12903 da tcs bioscience.

A *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12903 vem em forma de um disco Selectro®, dentro de um frasco de vidro opaco e selado, como se encontrava conservada no frigorífico, para a sua utilização foi aquecido até à temperatura ambiente.

Após atingir a temperatura ambiente foi dissolvido em Ringer e incubado a 36 ± 2 °C durante 18 ± 2 horas.

4.4.2- Preparação das diluições

Após a incubação de *Pseudomonas aeruginosa*-NCTC 12903 foram preparadas as diluições para preparação da amostra, segundo indicação da marca, considera-se que existem 10^8 organismos por mL.

Para a diluição A foi pipetado 1mL da solução mãe e adicionada água desionizada estéril até perfazer 1000 mL, agitando vigorosamente, para a homogeneidade da contaminação. Para a diluição B foi pipetado 1 mL da solução A e perfez-se os 100 mL com água desionizada estéril. Por fim a solução

C foi preparada adicionando 10 mL de solução B e foi adicionada água desionizada estéril até perfazer 1000 mL. A solução C foi a solução que constituiu as amostras, para implementação do método.

4.4.3- Filtração e incubação

Para a realização da filtração por membrana, foram realizados os seguintes passos, inicialmente esteriliza-se a pinça e os discos porosos das bases filtrantes da rampa de filtração com álcool (96%) e chama. Segue-se a desinfecção das mãos (álcool 70%) e com a pinça esterilizada coloca-se a membrana estéril no disco poroso da base, com o quadriculado virado para cima. Entretanto é colocado o funil estéril na base filtrante e a quantidade de amostra a ser filtrada é colocada neste. A bomba de vácuo é ligada e abre-se a torneira para dar início à filtração. A torneira é fechada e a bomba desligada após a amostra ter sido filtrada (evitar que a membrana fique demasiado seca). O funil é retirado e transfere-se a membrana para o meio de cultura, como este é sólido, verificar que não existem bolhas de ar entre a membrana e o meio.

Após a filtração incubou-se as amostras a 36 ± 2 °C durante 44 ± 4 horas.

4.4.4- Contagem das colónias

A contagem das colónias realizou-se na sala de contagem e repicagem, em que as placas foram retiradas da estufa após o período de incubação e contadas as colónias. No caso em estudo como se tratavam de colónias características (verdes) não houve necessidade de testes de confirmação, uma vez que se tratava de *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12903.

4.4.5- Validação da metodologia

De acordo com a norma NP ISO/IEC 17025:2005 existem vários fatores que determinam a exatidão e fiabilidade dos ensaios/calibrações realizados num laboratório, entre os quais: fatores humanos, as instalações e condições ambientais, os métodos de ensaio e calibração, os equipamentos, a rastreabilidade das medições, a amostragem e o manuseamento de itens a ensaiar ou calibrar.

Tendo em atenção o ponto 4.4.5-validação de métodos, da referida norma, a validação consiste na confirmação, através de análise e apresentação de evidência objetiva de que os requisitos específicos para determinada utilização pretendida são satisfeitos. Os métodos normalizados, não normalizados e métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório devem ser validados para confirmar que os métodos são adequados à utilização prevista (Guia Relacre 6, 2007).

No trabalho em questão, o método implementado tem por base uma norma internacional, ISO 16266:2006 sem qualquer tipo de alteração, sendo necessário o registo dos resultados de implementação da mesma em como cumpre os requisitos a que é proposto.

Segundo recomendações do Instituto Português de Acreditação e Certificação (IPAC), a confirmação dos métodos como adequados à utilização prevista deve de ser registado num documento, relatório de validação/implementação, onde deverá conter no mínimo (Araújo, 2015):

- Experiência do método (número de determinações efetuadas), é recomendado a realização de 30 ensaios contudo em regulamento interno da empresa está definido que deverá ser realizada a análise em pelo menos 10 amostras com resultados positivos.
- Ensaios Intralaboratoriais- controlo da qualidade interno, realizado com base no estabelecimento anual do Critério de Precisão (ensaios em duplicado) e Incertezas (ensaios em paralelo).
- Avaliação da incerteza- cálculo das Incertezas segundo a norma ISO 29291:2012.
- Qualificação do analista para o método- de acordo com o regulamento interno da empresa, a qualificação do analista é feita através de Ensaios Interlaboratoriais e a realização de ensaios em paralelo para o estabelecimento das Incertezas.
- Participação, em pelo menos, um ensaio Interlaboratorial com resultados satisfatórios

O controlo da seletividade do meio *Pseudomonas Agar Base*/ CN-agar foi realizado com *E. coli*, controlo negativo e o controlo qualidade dos meios de cultura utilizados nas metodologias referidas foi realizado, incubando, placas contendo só o meio de cultura a 36 ± 2 °C durante 44 ± 4 horas, seguido da verificação dos mesmos.

4.4.5.1- Controlo da qualidade interna

De acordo com o Guia Relacre nº6, o controlo de qualidade interno consiste numa avaliação contínua dos procedimentos efetuados pelo laboratório, para assegurar a consistência dos resultados

e a sua conformidade. É necessário ser realizado periodicamente para se demonstrar que a variabilidade está controlada. É recomendado que sempre que possível, os ensaios incorporem controlos para monitorizar o desempenho.

A reprodutibilidade intralaboratorial tem como princípio avaliar os resultados caso existam fatores que variem, na realização da análise por outro analista, como equipamentos, reagentes, condições de incubação, dando uma estimativa geral da incerteza do método (Guia Relacre 29, 2016).

4.4.5.2- Critério de Precisão

Nos laboratórios da SGS uma forma de controlar internamente a qualidade é através do Critério de Precisão, que é aplicado num gráfico dando origem à carta de duplicados, que deve de ser revista ao longo do tempo. (Araujo,2015)

Tem como objetivo a visualização e o controlo da metodologia aplicada estabelecendo um limite superior, designado por Critério de Precisão, realizado de acordo com o Guia da IPAC- Controlo de Qualidade em Laboratórios de Microbiologia (Araujo, 2015).

Para o cálculo do critério de precisão, cada par de análise (duplicados) realizados pelo mesmo analista é convertido em logaritmo de base 10 sendo depois calculado o módulo da amplitude dos logaritmos (DR).

$$x_1 \text{ e } x_2 - \text{duplicados}, y_1 = \log_{10} x_1 \text{ e } y_2 = \log_{10} x_2, DR = |y_1 - y_2|$$

Após o cálculo de DR para todas as amostras (n), calcula-se a média e por fim o Critério de Precisão (CP), multiplicando a média por 3,27 (constante tabelada para 2 réplicas de amostra).

$$CP = 3,27 \times \frac{\sum DR}{n}$$

O ensaio é aceite se a amplitude for inferior ao Critério de Precisão, que é o limite superior.

Através do cálculo do CP é possível traçar a carta de duplicados, que permite fazer o controlo de qualidade dos resultados, através de uma representação gráfica. Como se trata de uma ferramenta

simples, eficiente e de fácil entendimento permite controlar resultados, ajudando a detetar erros e tendências assim como resultados fora dos limites (Guia Relacre 3, 1996).

4.4.5.3- Estimativa das Incertezas

A estimativa das incertezas para a metodologia descrita, foi definida de acordo com o descrito na ISO 29291:2012.

Em 2016 a Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal (RELACRE), publicou o Guia Relacre nº29, com orientações para a o tratamento estatístico da avaliação da incerteza nos ensaios microbiológicos quantitativos baseados na enumeração de partículas microbianas por cultura com base na ISO 29291:2012.

O Guia Relacre nº29 têm como objetivo especificar como são obtidos os valores de variância operacional intralaboratorial, variância operacional intrínseca e da incerteza combinada, contudo e de acordo com o procedimento interno da SGS os valores a ter em conta para a implementação do método internamente são a variância operacional intralaboratorial e a variância operacional intrínseca.

A variabilidade operacional é a combinação de todas as incertezas associadas às etapas técnicas do procedimento analítico, incluindo a variabilidade das subamostras, da mistura, da diluição, os possíveis efeitos da incubação e da incerteza da leitura do resultado. A variância intrínseca é a variação inevitável, que está associada à distribuição das partículas na suspensão final e no sistema de quantificação (Guia Relacre 29, 2016).

A intenção do cálculo da variância operacional é estimar quanto é que o resultado pode variar se a análise for realizada por outro analista, do mesmo laboratório, dando uma estimativa geral da incerteza do método, uma vez que são realizados ensaios em paralelo (Guia Relacre 29, 2016).

As estimativas dependem do número de amostras analisadas, o guia recomenda a utilização de pelo menos 30 amostras, contudo pode ser calculada uma primeira estimativa da incerteza operacional, provisória, com a análise de 10 amostras.

A tabela 4.8 contém as equações necessárias para o cálculo das incertezas.

Tabela 4.8- Equações para cálculo da Estimativa de Incertezas (ISO 29201:2012)

n	Número de amostras
	$U_{Ri}^2 = \frac{(\log n_{1i} - \log n_{2i})^2}{2}$
	$U_{di}^2 = \frac{0,1886}{\bar{n}_i}$
Variância Padrão Reprodutibilidade (U_R^2)	$U_R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (U_{Ri}^2)}{n}$
Variância da Distribuição (U_d^2)	$U_d^2 = \frac{\sum_{i=1}^n U_{di}^2}{n}$
Variância da Distribuição relativa ($U_{d,rel}^2$)	$U_{d,rel}^2 = 5,3019 \times U_d^2$
Incerteza Intrínseca (U_d)	$U_d = \sqrt{U_d^2}$
Incerteza Intrínseca Relativa ($U_{d,rel}$)	$U_{d,rel} = \sqrt{U_{d,rel}^2}$
Variância Operacional (U_o^2)	$U_o^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (U_{Ri}^2 - U_{di}^2)}{n}$
Variância Operacional relativa ($U_{o,rel}^2$)	$U_{o,rel}^2 = 5,3019 \times U_o^2$
Incerteza Operacional (U_o)	$U_o = \sqrt{U_o^2}$
Incerteza Operacional Relativa ($U_{o,rel}$)	$U_{o,rel} = \sqrt{U_{o,rel}^2}$

n_1 e n_2 – resultados analista 1 e analista 2; \bar{n} – média dos resultados

Para converter variâncias de uma escala logarítmica para outra, é usado o quadrado do fator de conversão. De logaritmos comuns para logaritmos naturais: $(2,30259)^2 = 5,3019$ e de logaritmos naturais para logaritmos comuns: $(0,4343)^2 = 0,1886$ (Guia Relacre 29, 2016)

4.4.5.4- Ensaio Interlaboratorial

Os analistas são uma componente muito importante nos resultados das análises, é, portanto, necessário realizar a sua qualificação, na SGS, esta é realizada através de ensaios interlaboratoriais e de ensaios intralaboratoriais (em paralelo) para o estabelecimento das incertezas (4.4.5.3).

Por definição os ensaios interlaboratoriais requerem a participação de pelo menos dois laboratórios, contudo para que os resultados tenham significado estatístico e que sejam conclusivos deve ter pelo menos cinco laboratórios participantes (Guia Relacre 7, 1996).

O ensaio interlaboratorial estuda o desempenho do analista e do laboratório comparando resultados com a finalidade de avaliar os técnicos participantes. Quando os laboratórios participantes utilizam o mesmo método e protocolo é possível identificar características de execução do método, como erros sistemáticos e de precisão (Guia Relacre 7, 1996).

Com base no Guia Relacre 13, publicado em 2000, a avaliação do desempenho do laboratório participante é avaliada, geralmente, através da fórmula do “Z-score”, apresentada em baixo.

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{S}$$

Em que:

X_{lab} - valor obtido pelo laboratório, X_v - valor aceite como verdadeiro, estabelecido no ensaio interlaboratorial e S- unidade de desvio

A avaliação pode ser feita segunda a seguinte escala de avaliação: $|Z| \leq 2$ - Satisfatório, $2 < |Z| \leq 3$ - Questionável, $|Z| > 3$ - Incorreto (Guia Relacre 13, 2000).

4.5- Procedimento experimental para a pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* em águas de fontes usadas potencialmente para consumo

A presente pesquisa realizou-se, pelo fato de o recurso a águas de fontanários, bicas e fontes ser um hábito antigo, fazendo parte da história cultural do país.

Apesar da criação, expansão e melhoramento das redes de abastecimento público ainda existe uma parte da população que se dirige às fontes para a procura de água de consumo. Esta procura está associada por vezes a histórias antigas e também às características organoléticas das águas distribuídas pela rede pública de abastecimento de água.

O aumento demográfico, o crescimento industrial, o aumento do consumo, a agricultura e pecuária tem vindo a criar desequilíbrios na qualidade da água na sua origem, esta água está muitas vezes sujeita a contaminações diretas e indiretas.

A água tem a capacidade de dissolver e transportar diversas substâncias e através do seu contato com ar, solo e até mesmo com atividades humanas pode adquirir impurezas e alterar características.

A legislação portuguesa no DL 306-2007 não obriga ao controlo da sua qualidade. As fontes e fontanários de águas não públicas, caso não sejam controladas, devem ter fixada a informação. Já que não possuem tratamento/ desinfecção, são mais vulneráveis a contaminações (químicas e biológicas) e outros riscos que podem acarretar perigos para a saúde.

O consumo destas águas mesmo que não provoquem qualquer tipo de problema de saúde visível, não implica que esta se encontre própria para consumo, é de referir que idosos, crianças, imunodeprimidos e pessoas com outros problemas associados correm um risco maior.

No presente trabalho verificou-se a pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* em 10 fontes e bicas, do distrito de Lisboa.

4.5.1-Amostras

A escolha deste tipo de amostras baseou-se no fato de o distrito de Lisboa ter uma grande quantidade de água subterrânea, de ainda existirem lendas em relação a águas milagrosas sendo uma questão cultural principalmente em aldeias do distrito em que as freguesias têm um chafariz ou uma fonte, onde antigamente a população se ia abastecer de água. As amostras foram recolhidas em 3 concelhos do distrito de Lisboa, Loures (6 amostras), Mafra (1 amostra) e Sintra (3 amostras), como demonstrado na tabela 4.9.

Tabela 4.9- Código das amostras, concelho de recolha e tipo de fonte

Amostra	Concelho	Tipo
F1	Sintra	Tradicional
F2	Sintra	Tradicional
F3	Sintra	Tradicional
F4	Mafra	Tradicional
F5	Loures	Dispositivo
F6	Loures	Natural
F7	Loures	Natural
F8	Loures	Tradicional
F9	Loures	Tradicional
F10	Loures	Dispositivo

As amostras foram recolhidas de três tipos de saída de água, fontes naturais em que a água brota das rochas e que o homem coloca um dispositivo para conseguir recolher a água (F6 e F7), fontes tradicionais construídas em cimento e que tem bicas a brotar água (F1, F2, F3, F4, F8 e F9) e fontes que a água tinha de ser retirada através de “manivela” (F5 e F10).

4.5.2- Colheita das amostras

A colheita das amostras foi realizada pelo estudante, uma vez que se tratou de um estudo de pesquisa. Seguindo as orientações do procedimento interno da empresa e as indicações existentes no DL 306-2007.

4.5.2.1-Técnica de colheita

Para se realizar a colheita de amostra de água, esta é efetuada segundo passos específicos que devem ser respeitados para não comprometer os resultados.

Quando existe torneira e caso exista qualquer tipo de dispositivo acoplado (borrachas, filtros, etc.) devem ser retirados. A torneira deve ser desinfetada, limpando a boca da torneira com algodão

embebido em álcool e de seguida mergulhá-la em álcool durante 2/3 minutos, utilizando um copo de plástico. Após a desinfecção da torneira as mãos devem ser higienizadas com o soluto alcoólico, para evitar contaminações.

Segue-se o escoamento da torneira durante 5 ou 10 segundos com o fluxo máximo, diminui-se o fluxo e deixa-se correr a água durante o tempo suficiente para eliminar a influência do desinfetante aplicado na torneira. Sem fechar a torneira, recolhe-se a amostra em frasco estéril (para evitar contaminações, o frasco só deve estar aberto o tempo necessário há recolha da amostra), não se enche o frasco por completo, rotula-se a amostra e esta deve ser acondicionada numa mala térmica.

Quando se encontra em escoamento livre (bica aberta), devem ser realizados todos os procedimentos referidos anteriormente, à exceção da sua desinfecção.

4.5.3- Filtração e incubação

As amostras foram conservadas no frio e analisadas no prazo máximo de 24 horas. O método de filtração realizou-se na sala de análises, numa câmara de fluxo laminar horizontal, com a pesquisa a ser realizada em triplicado.

Para a realização da filtração por membrana, foram realizados os passos referidos no ponto 4.4.3.

Após a filtração incubou-se as amostras a 36 ± 2 °C durante 44 ± 4 horas.

4.5.4-Contagem das colónias

A contagem das colónias realiza-se na sala de contagem e repicagem, em que as placas são retiradas da estufa após o período de incubação e analisadas, as colónias verdes foram registadas como *Pseudomonas aeruginosa*, verifica-se o crescimento microbiano e de fluorescência sob luz UV.

Caso existam colónias não características, são efetuados os testes de confirmação, iniciando com a purificação/isolamento das colónias em PCA incubadas a 36 ± 2 °C durante 22 ± 2 horas.

4.5.5- Testes de confirmação

Após a purificação/isolamento das colónias em PCA se existir o crescimento de colónias Castanhas avermelhadas não fluorescente tem de ser realizado o teste de oxidase, a verificação da fluorescência em KING B e a verificação da produção de amónia. No caso de os microrganismos serem fluorescentes não produtores de piocianina só é necessária a confirmação de produção de amónia.

4.5.6- Contagem de colónias *Pseudomonas aeruginosa*

São consideradas como *Pseudomonas aeruginosa*, todas as colónias com cor verde/ azulado, todas as colónias castanho avermelhadas que são oxidase positiva, produtoras de fluorescência e amónia a partir de acetamida e todas as colónias fluorescentes, que não são nem azuis nem verdes, que produzem amónia.

5- Resultados e discussão

5.1- Implementação do método ISO 16266:2006

5.1.1-Resultados Implementação do método ISO 16266:2006

5.1.1.1- Resultado da contagem de *Pseudomonas aeruginosa*

A tabela 5.1 apresenta os resultados das contagens de 18 amostras realizadas para a implementação do método descrito na ISO 16266:2006, estão apresentados os resultados dos duplicados assim como a média das contagens para cada amostra.

Tabela 5.1-Análise da contagem dos ensaios em duplicado para implementação da ISO 16266:2006

Nº amostra	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFC/100 mL)		
	ISO 16266:2006		
	E1	E2	Média
1	25	27	26
2	35	27	31
3	7	5	6
4	9	7	8
5	28	23	26
6	23	24	24
7	35	38	37
8	45	39	42
9	10	14	12
10	15	16	16
11	0	0	0
12	0	0	0
13	4	9	7
14	8	11	10
15	23	15	19
16	14	18	16
17	20	25	23
18	19	28	24
19 (branco)	0	0	0

Das 18 amostras filtradas em duplicado, duas não apresentaram crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*s (amostra 11 e 12) e três tiveram menos de 10 colônias de média em cada placa por 100 mL de água filtrada.

5.1.1.2- Critério de Precisão

Tabela 5.2- Critério de Precisão, para os ensaios realizados em duplicado, para implementação da ISO 16266:2006

Amostra	x_1	x_2	$y_1 = \log_{10} x_1$	$y_2 = \log_{10} x_2$	$DR = y_1 - y_2 $	n	$\sum DR$	$\frac{\sum DR}{n}$	CP	Aceitação*
Amostra 1	25	27	1,398	1,431	0,033	13	1,220	0,094	0,307	aceite
Amostra 2	35	27	1,544	1,431	0,113					aceite
Amostra 5	28	23	1,447	1,362	0,085					aceite
Amostra 6	23	24	1,362	1,380	0,018					aceite
Amostra 7	35	38	1,544	1,580	0,036					aceite
Amostra 8	45	39	1,653	1,591	0,062					aceite
Amostra 9	10	14	1,000	1,146	0,146					aceite
Amostra 10	15	16	1,176	1,204	0,028					aceite
Amostra 14	8	11	0,903	1,041	0,138					aceite
Amostra 15	23	15	1,362	1,176	0,186					aceite
Amostra 16	14	18	1,146	1,255	0,109					aceite
Amostra 17	20	25	1,301	1,398	0,097					aceite
Amostra18	19	28	1,279	1,447	0,168					aceite
*Considera-se aceitável se DR for inferior ao valor de CP										



Figura 5.1-Carta de duplicados correspondente às contagens de *Pseudomonas aeruginosa*, em 13 amostras, CP- Critério de Precisão e DR é a amplitude.

A tabela 5.2 apresenta os cálculos do Critério de precisão para 13 amostras. De acordo com os cálculos apresentados o Critério de Precisão (CP), valor máximo, de 0,307 foi superior a todos os valores de amplitude dos logaritmos (DR). Deste modo, considera-se os resultados como aceites. A Figura 5.1 é uma representação gráfica dos cálculos apresentados na tabela anterior.

5.1.1.3- Estimativa da Incerteza para a metodologia

Tabela 5.3-Determinação da estimativa da Incerteza da metodologia.

Amostra	n_{c1}	n_{c2}	$y_1=\log n_{c1}$	$y_2=\log n_{c2}$	$Y=y_1-y_2$	$U_{Ri}^2 = \frac{Y^2}{2}$	$\bar{n}_i = \frac{n_{c1} + n_{c2}}{2}$	$U_{di}^2 = \frac{0,1886}{\bar{n}_i}$	$U_{oi}^2 = U_{Ri}^2 - U_{di}^2$
1	25	22	1,39794	1,34242	0,05552	0,00154	24	0,00786	-0,00632
2	35	28	1,54407	1,44716	0,09691	0,00470	32	0,00589	-0,00120
3	7	13	0,84510	1,11394	-0,26885	0,03614	10	0,01886	0,01728
4	9	15	0,95424	1,17609	-0,22185	0,02461	12	0,01572	0,00889
5	28	23	1,44716	1,36173	0,08543	0,00365	26	0,00725	-0,00360
6	23	18	1,36173	1,25527	0,10646	0,00567	21	0,00898	-0,00331
7	35	40	1,54407	1,60206	-0,05799	0,00168	38	0,00496	-0,00328
8	45	33	1,65321	1,51851	0,13470	0,00907	39	0,00484	0,00424
9	10	14	1,00000	1,14613	-0,14613	0,01068	12	0,01572	-0,00504
10	15	20	1,17609	1,30103	-0,12494	0,00780	18	0,01048	-0,00267
11	4	8	0,60206	0,90309	-0,30103	0,04531	6	0,03143	0,01388
12	8	6	0,90309	0,77815	0,12494	0,00780	7	0,02694	-0,01914
13	23	16	1,36173	1,20412	0,15761	0,01242	20	0,00943	0,00299
14	14	18	1,14613	1,25527	-0,10914	0,00596	16	0,01179	-0,00583
15	20	17	1,30103	1,23045	0,07058	0,00249	19	0,00993	-0,00744

Tabela 5.4-Resultado do cálculo da Estimativa de Incerteza

n	15
Variância Padrão Reprodutibilidade ($U_R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (U_{Ri}^2)}{n}$)	0,01197
Variância da Distribuição ($U_d^2 = \frac{\sum_{i=1}^n U_{di}^2}{n}$)	0,01267
Variância da Distribuição relativa ($U_{d,rel}^2 = 5,3019 \times U_d^2$)	0,06718
Incerteza Intrínseca ($U_d = \sqrt{U_d^2}$)	0,1126
Incerteza Intrínseca Relativa % ($U_{d,rel} = \sqrt{U_{d,rel}^2}$)	25,9%
Variância Operacional ($U_o^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (U_{oi}^2)}{n}$)	0,003152
Variância Operacional relativa ($U_{o,rel}^2 = 5,3019 \times U_o^2$)	0,01671
Incerteza Operacional ($U_o = \sqrt{U_o^2}$)	0,05614
Incerteza Operacional Relativa % ($U_{o,rel} = \sqrt{U_{o,rel}^2}$)	12,9%

As tabelas 5.3 e 5.4 apresentam os resultados dos cálculos quer intermédios quer finais para a Estimativa da Incerteza associada à metodologia. A Incerteza Intrínseca Relativa (%) foi de 25,9% enquanto que a Incerteza Operacional Relativa (%) foi de 12,9%.

É de referir que teoricamente a variância operacional (U_{oi}^2) nunca deve ser negativa, contudo como se tratam de resultados experimentais e tal aconteceu, esses valores foram tomados como 0 (Guia Relacre 29, 2016).

5.1.2- Discussão de resultados

De acordo com o regulamento interno estabelecido pela SGS, foi cumprido o requisito para a implementação/validação do método, no qual o número mínimo de amostras positivas analisadas deve de ser de pelo menos 10 (tabelas 5.1 e 5.2), de modo a determinar o critério de precisão, estimativa da incerteza intrínseca relativa e incerteza operacional relativa.

Em relação ao Critério de Precisão, estão apresentados 13 das 18 amostras analisadas, pois não são contabilizados para os cálculos resultados (médios) inferiores a 10 UFC/100 mL de acordo com o estabelecido no regulamento interno, assim sendo as amostras 3,4,11,12 e 13 não estão representadas na tabela 5.2.

O Critério de Precisão e a Carta de Duplicados são ferramentas estatísticas com importância, pois avaliam o desempenho do analista no laboratório ao longo do tempo, sendo assim avaliada a sua consistência e se existe interferência do mesmo no processo experimental (Araújo, 2015). O Critério de Precisão deve ser avaliado e atualizado ao longo do tempo para que cada analista possa avaliar, e descobrir possíveis interferências.

Como se pode verificar na figura 5.1, nenhum dos valores de DR se encontra acima da linha limite de controlo (CP), ou seja, nenhum dos valores foi rejeitado, do que se conclui que o analista não teve interferência nas medições. Todos os valores se encontram na mesma escala logarítmica e como tal são aceites para validação/ implementação do método.

Nos resultados da Estimativa das Incertezas foram obtidos os resultados de 25,9% para Incerteza Intrínseca Relativa (%) e de 12,9% para a Incerteza Operacional Relativa (%). Os valores podem ser justificados pelo fato de terem sido realizados poucos ensaios em paralelo, até ao término do estágio, 15 assim como pelo fato de terem sido obtidos números baixos de UFC/100 mL.

De acordo com o Guia Relacre 29 é recomendado a realização de pelo menos 30 amostras, de preferência amostras naturais. Por outro lado, as contagens baixas e confirmações parciais devem de ser evitadas, se possível na fase experimental, pois fazem aumentar a imprecisão da estimativa da incerteza operacional, se não conseguir ser evitado devem ser realizadas o maior número de amostras possíveis para que se consiga chegar ao valor correto e real da incerteza operacional.

Ensaio Interlaboratorias realizados antes do início do estágio mostraram resultados satisfatórios para todos os técnicos do laboratório de microbiologia da SGS. Encontrando-se todos os valores do módulo Z-score abaixo do valor 1 para o ensaio interlaboratorial para *Pseudomonas aeruginosa*.

. 5.2- Pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* em águas de fontes usadas potencialmente para consumo

A pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* em águas de fontes consistiu na aplicação da norma ISO 16266:2006. O volume filtrado para cada ensaio foi de 100 mL, especificado no normativo referido, que indica que outras águas para consumo, que não águas minerais e de nascente, por vezes são testadas para *Pseudomonas aeruginosa* por uma questão de saúde pública, sendo o volume normal analisado de 100 mL.

Os ensaios foram realizados em triplicado (A, B, C), com brancos e testes de controlo dos meios previamente preparados.

Nos resultados e discussão as fontes serão identificadas de F1 a F10.

5.2.1- Resultado e discussão da pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* em 10 fontes

5.2.1.1- Análise das placas.

Na tabela 5.5 estão evidenciados os resultados da pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* em 10 fontes do distrito de Lisboa, como se pode observar em 4 das 10 fontes, existiu o crescimento de um tipo de microrganismo potencialmente *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 5.5- Teste para *P. aeruginosa* em placas de “*Pseudomonas Agar Base/ CN-agar*”, após a incubação.

Amostra	A	B	C
Branco	-	-	-
F1	-	-	-
F2	-	-	-
F3	-	-	-
F4	c)	c)	c)
F5	c)	c)	c)
F6	c)	c)	c)
F7	-	-	-
F8	-	-	-
F9	-	-	-
F10	c)	c)	c)
c) placas com crescimento de bactéria presumivelmente <i>Pseudomonas aeruginosa</i>			

As placas das fontes F4, F5, F6 e F10 todas continham colónias brancas, achatadas, e fluorescentes sob luz UV. As colónias foram isoladas em PCA para se prosseguir os testes de confirmação.

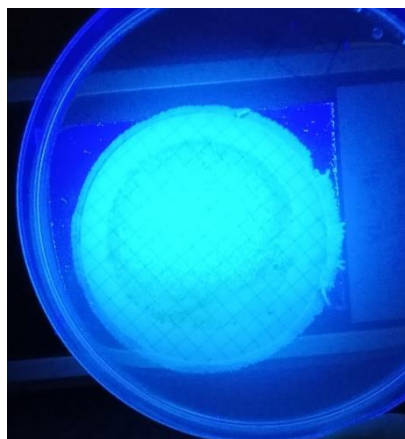


Figura 5.2- Verificação da fluorescência- colônias que cresceram na membrana de filtração em meio *Pseudomonas* Agar Base/CN



Figura 5.3- Colônias que se desenvolveram em F4, F5, F6 e F10 em meio *Pseudomonas* Agar Base/CN

5.2.1.2- Testes de confirmação

Tabela 5.6- Resumo dos resultados dos testes de confirmação

Amostra	Teste de confirmação	
	Fluorescência	Produção de amônia
F4	sim	não
F5	sim	não
F6	sim	não
F10	sim	não

Nas quatro amostras (F4, F5, F6 e F10) as placas tinham fluorescência (figura 5.2), mas após o teste de confirmação para a produção de amônia, todos os resultados foram negativos. Não havendo, portanto, a presença de *Pseudomonas aeruginosa* nas águas analisadas. O que não garante a segurança das águas das fontes, uma vez que neste estudo só se realizou a pesquisa para *Pseudomonas aeruginosa*.

Em 2001, Victorica e Galván após um surto de gastroenterite realizaram uma pesquisa, em que demonstraram que existia uma correspondência entre a presença de *P. aeruginosa* e as infecções gastrointestinais que foram identificadas, reforçando a necessidade da inclusão de outros microrganismos como indicadores de saúde em águas de consumo.

Segundo um trabalho desenvolvido por Casanovas-Massana e colaboradores, publicado em 2010 mostrou que os testes básicos recomendados na ISO 16266:2006 podem não ser suficientemente conclusivos para confirmar a presença deste patogénico, pois os testes baseiam-se na produção de pigmentos e existem estirpes ambientais de *Pseudomonas aeruginosa* que não produzem esses pigmentos. No estudo detetaram dois falsos negativos para os testes indicados na ISO 16266:2006, para estirpes atípicas que não produzem pigmentos. Uma forma de contornar estes resultados são os testes em Meio King A a 4 °C e 42 °C, pois no mesmo as duas estirpes foram discriminadas com este teste.

Tendo em conta o estudo realizado por Akturk *et al.*, em 2012 em que este grupo analisou a qualidade microbiológica de água de fontes na Turquia durante 10 meses, em recolhas sazonais, a 15 fontes diferentes, os resultados obtidos foram claros em relação à contaminação por bactérias aeróbias, entre as quais *Pseudomonas aeruginosas*, coliformes totais e coliformes fecais. O crescimento bacteriano foi analisado em relação a vários parâmetros como o pH da água, quantidade de oxigénio dissolvido, condutividade da água e temperatura da água. Um dos fatores que mais fez variar o crescimento microbiano foi a temperatura da água.

No estudo de Akturk e colaboradores (2012) foram isolados 273 microrganismo dos quais 51 eram *P. aeruginosas*, ao estudarem a resistência a antibióticos concluíram que os níveis de resistência a antibióticos das bactérias isoladas de *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram uma resistência superior em relação aos outros isolados.

O aparecimento em águas de consumo de potenciais resistências a antibióticos necessita de uma vigilância e avaliação de riscos e estratégias para proteger a saúde pública, pois a água de fontes pode atuar como uma fonte possível de transferência de agentes patogénicos muito resistentes a antibióticos, assim como a passagem do seu material genético para os seres humanos podendo as

doenças microbianas com origem na água representar um risco significativo para a saúde (Akturk *et al.*, 2012).

É importante referir que a pesquisa realizada nesta dissertação (pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* em 10 fontes) não é significativa a nível estatístico em relação à presença ou ausência deste tipo de microrganismo, uma vez que só foi realizada uma colheita e uma análise (em triplicado) para cada fonte, sendo necessário para um resultado mais conclusivo, uma avaliação mais aprofundada, com mais colheitas e tendo em conta outros fatores, como por exemplo temperatura e pH da água.

6-Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, a qualificação dos analistas, realizada através de Ensaio Interlaboratoriais e a realização de ensaios em paralelo, a Estimativa das Incertezas para a metodologia em constante atualização, e o Controlo da Qualidade (estabelecimento anual do Critério de Precisão e Incertezas e controlo da qualidade dos meios de acordo com o estabelecido em procedimento interno), considera-se que o método ISO 16266:2006 foi implementado e validado no laboratório da SGS. Sendo adequado ao uso, cumprindo todos os requisitos legais.

Os resultados obtidos na pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* em águas de 10 fontes usadas potencialmente para consumo humano, foram todos negativos. Contudo não se pode concluir que a água analisada seja segura para o consumo humano. Para uma avaliação e conclusão mais efetiva, teriam se ser realizados mais estudos com colheitas em diferentes alturas, e a pesquisa de materiais que transportam a água até à saída da mesma para o exterior. Seria também interessante fazer um levantamento estatístico de que fontes são utilizadas ainda para o consumo humano, mesmo com os avisos de que as águas não são analisadas e fazer um estudo da qualidade das mesmas.

Bibliografia

Akturk S., Dincer S., Toroglu S. (2012). *Determination of microbial quality and plasmid-mediated multidrug resistant bacteria in fountain drinking water sources in Turkey*. Journal of Environmental Biology; 33(6): 1127-1136

Araújo, S. V. O. (2015). *Implementação de metodologias para a contagem da flora específica do iogurte e de bifidobactérias na empresa SGS Portugal, SA*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

Archer J. (2013), ID# 16876, Public Health Image Library, Centers for Disease Control and Prevention em <https://phil.cdc.gov/phil/details.asp> acesso a 26 de Agosto de 2017

ARSLVT (2008). *Vigilância Sanitária da Água Destinada ao Consumo Humano – orientações face ao Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto*. Administração Regional de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo, Departamento de Saúde Pública

Breidenstein, E. B., de la Fuente-Núñez, C., Hancock, R. E. (2011). *Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance*. Trends in Microbiology, 19(8), 419-426.

Casanovas-Massana, A., Lucena, F., Blanch, A. R. (2010). *Identification of Pseudomonas aeruginosa in water-bottling plants on the basis of procedures included in ISO 16266: 2006*. Journal of Microbiological Methods, 81(1), 1-5.

Cornelis, P. (2008). *Pseudomonas: genomics and molecular biology*. Cornelis P. (ed), Caister Academic Press, Norfolk, p.1-5

Costa, D., Bousseau, A., Thevenot, S., Dufour, X., Laland, C., Burucoa, C., Castel, O. (2015). *Nosocomial outbreak of Pseudomonas aeruginosa associated with a drinking water fountain*. Journal of Hospital Infection, 91(3), 271-274.

Da Silva, M. E. Z., Camargo Filho, I., Endo, E. H., Nakamura, C. V., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B. P. (2008). *Characterisation of potential virulence markers in Pseudomonas aeruginosa isolated from drinking water*. Antonie van Leeuwenhoek, 93(4), 323-334.

De Victorica, J., Galvan, M. (2001). *Pseudomonas aeruginosa as an indicator of health risk in water for human consumption*. Water Science and Technology, 43(12), 49-52.

Drinking-water- Fact sheet em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs391/en/> acesso a 31 Julho 2017

Ferreira, W. C, Sousa, J. C, Lima, N. (2010) *Microbiologia*. LIDEL- Edições Técnicas, Lisboa, p- 506-521

Garvey, M. I., Bradley, C. W., Holden, E., Weibren, M. (2017). *Where to do water testing for Pseudomonas aeruginosa in a healthcare setting*. Journal of Hospital Infection, 97(2):192-195.

Gerba, C. P. (2015). *Use of an ultraviolet light at point-of-dispense faucet to eliminate Pseudomonas aeruginosa*. American Journal of Infection Control, 43(5), 528-529.

Gholami, S., Tabatabaei, M., Sohrabi, N. (2017). *Comparison of biofilm formation and antibiotic resistance pattern of Pseudomonas aeruginosa in human and environmental isolates*. Microbial Pathogenesis, 109, 94-98.

Guia Relacre nº 3 (1996). *Validação de Resultados em Laboratórios Químicos*, Relacre, IPQ, Portugal

Guia Relacre nº 6 (2007). *Acreditação de Laboratórios de Ensaios Microbiológicos*, Relacre, IPQ, Portugal

Guia Relacre nº 7 (1996). *Ensaios Interlaboratoriais em Química*, Relacre, IPQ, Portugal

Guia Relacre nº 13 (2000). *Validação de Métodos Internos de Ensaios em Análise Química*, Relacre, IPQ, Portugal

Guia Relacre nº 29 (2016). *Estimativa de Incerteza em Ensaios Microbiológicos de Águas*, Relacre, IPQ, Portugal

HSE. (2008). *Drinking water and Health a review and guide for population health*, HSE Public Health Departments and Environmental Health Service. em https://hse.ie/eng/services/Publications/Environmentalhealth/HSE_Drinking_Water_and_Health_Review_and_Guide_2008.pdf acesso a 28 de Julho de 2017

Image Gallery- Low Angle Rotatory Shadowed TEM, Electron Microscopy Sciences em https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/gallery/Low_Angle_Rotary_Shadowed_TEM.aspx acesso a 28 Agosto de 2017

IPAC (2010). *Guia OGC001: Guia para a Aplicação da NP EN ISO/IEC 17025*, Instituto Português de Acreditação de Creditação Lisboa. em <http://www.ipac.pt/docs/publicdocs/regras/OGC001.pdf>, acesso a 16 de Agosto de 2017

ISO 16266 (2006): *Water Quality-Detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa-Method by membrane filtration*: International Standard Organization, Geneva, Switzerland

ISO 17025 (2005): *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*, International Standard Organization, Geneva, Switzerland

ISO 29201 (2012): *Water quality-The variability of test results and uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods*, International Standard Organization, Geneva, Switzerland

Kerr, K. G., Snelling, A. M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa: a formidable and ever-present adversary*. Journal of Hospital Infection, 73(4), 338-344.

Kipnis, E., Sawa, T., Wiener-Kronish, J. (2006). *Targeting mechanisms of Pseudomonas aeruginosa pathogenesis*. Medecine et Maladies infectieuses, 36(2), 78-91.

Kouchesfahani, M. M., Alimohammadi, M., Nodehi, R. N., Aslani, H., Rezaie, S., Asadian, S. (2015). *Pseudomonas aeruginosa and Heterotrophic Bacteria Count in Bottled Waters in Iran*. Iranian Journal of Public Health, 44(11), 1514-1519.

Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., Kong, F. (2004). *The role of pyocyanin in Pseudomonas aeruginosa infection*. Trends in Molecular Medicine, 10(12), 599-606.

Lefebvre, A., Bertrand, X., Quantin, C., Vanhems, P., Lucet, J. C., Nuemi, G., Aho-Glélé, L. S. (2017). *Association between Pseudomonas aeruginosa positive water samples and healthcare-associated cases: nine-year study at one university hospital*. Journal of Hospital Infection, 96(3), 238-243.

Legnani, P., Leoni, E., Rapuano, S., Turin, D., Valenti, C. (1999). *Survival and growth of Pseudomonas aeruginosa in natural mineral water: a 5-year study*. International Journal of Food Microbiology, 53(2), 153-158.

Lyczak, J. B., Cannon, C. L., Pier, G. B. (2000). *Establishment of Pseudomonas aeruginosa infection: lessons from a versatile opportunist*. Microbes and Infection, 2(9), 1051-1060.

Mena, K. D., Gerba, C. P. (2009). *Risk assessment of Pseudomonas aeruginosa in water*. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 201, 71-115

Ngwa, G. A., Schop, R., Chow, J., Lukic, L., McKague, K. (2017). *Comparative detection and recovery of Pseudomonas aeruginosa by membrane filtration and a Most Probable Number technique*. Journal of Microbiological Methods, 133, 76-81.

SGS (2017a) SGS Portugal- SGS em Portugal em <http://www.sgs.pt> acesso em Agosto de 2017

SGS (2017b) A SGS de forma resumida em <http://www.sgs.pt> acesso em Agosto de 2017

Stender, H., Broomer, A., Oliveira, K., Perry-O'Keefe, H., Hyldig-Nielsen, J. J., Sage, A., Coull, J. (2000). *Rapid detection, identification, and enumeration of Pseudomonas aeruginosa in bottled water using peptide nucleic acid probes*. Journal of Microbiological Methods, 42(3), 245-253.

Stoler, J., Ahmed, H., Frimpong, L. A., Bello, M. (2015). *Presence of Pseudomonas aeruginosa in coliform-free sachet drinking water in Ghana*. Food Control, 55, 242-247.

Suzuki, Y., Kajii, S., Nishiyama, M., Iguchi, A. (2013). *Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa isolates collected from river water in Japan to antipseudomonal agents*. Science of the Total Environment, 450, 148-154.

Vaz-Moreira, I., Nunes, O. C., Manaia, C. M. (2012). *Diversity and antibiotic resistance in Pseudomonas spp. from drinking water*. Science of the Total Environment, 426, 366-374.

Vieira de Medeiros, L., Vasconcelos, U., Torres Calazans, G. M. (2007). *Ocorrência de linhagens de Pseudomonas aeruginosa cloro resistentes em águas de diferentes origens*. Acta Scientiarum. Biological Sciences, 29(3), 309-313.

World Health Organization. (2011). *Guidelines for drinking-water quality* (4ª edição). World Health Organization.

Wu, Q., Ye, Y., Li, F., Zhang, J., Guo, W. (2016). *Prevalence and genetic characterization of Pseudomonas aeruginosa in drinking water in Guangdong Province of China*. LWT-Food Science and Technology, 69, 24-31.